

UNTERSUCHUNGEN ZUR AKTIVITÄT
UND STRUKTUR VON ACETYL-CoA-CARBOXYLASE
AUS ACHROMOBACTER IVS

Michael Obermayer

1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNTERSUCHUNGEN ZUR AKTIVITÄT UND STRUKTUR VON
ACETYL-CoA-CARBOXYLASE AUS ACHROMOBACTER IVS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilian-Universität
München



vorgelegt von
Michael Obermayer

München 1976

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lynen
2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juli 1976



Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einführung	1
II. Ergebnisse	6
A. Acetyl-CoA-Carboxylase aus Achromobacter IVS	6
1. Nachweis der Aktivität	6
2. Aktivität unter verschiedenen Wachstumsbedingungen	11
3. Lokalisierung der Aktivität in der Zelle	15
4. Trennung der Teilaktivitäten	19
B. Carboxyl Carrier Protein aus Achromobacter IVS	22
1. Isolierung eines 11 000 Dalton Polypeptids	22
2. Nachweis eines 22 000 Dalton Polypeptids	23
3. Isolierung des 22 000 Dalton Polypeptids	26
4. Charakterisierung des Carboxyl Carrier Proteins	30
5. Enzymatische Aktivität des Carboxyl Carrier Proteins	41
C. Biotin-Carboxylase aus Achromobacter IVS	45
D. Carboxyl-Transferase aus Achromobacter IVS	54
E. Rekonstitution der Acetyl-CoA-Carboxylase aus den angereicherten Teilenzymen	58
III. Diskussion	59

	Seite
IV. Experimentelles	64
A. Verwendete Geräte	64
B. Hilfsenzyme und Chemikalien	65
C. Züchtung von <u>Achromobacter</u> IVS	66
D. Züchtung von <u>Escherichia coli</u> B	69
E. Bestimmung der Enzymaktivitäten	70
1. Acetyl-CoA-Carboxylase, Gesamt- reaktion, radioaktiv	70
2. Acetyl-CoA-Carboxylase, Gesamt- reaktion, optisch	72
3. Biotin-Carboxylase, radioaktiv	72
4. Biotin-Carboxylase, optisch	73
5. Carboxyl-Transferase, radioaktiv	75
6. Carboxyl-Transferase, optisch	75
7. Stöchiometrischer Test des Carboxyl Carrier Proteins	75
F. Darstellung und Bestimmung von Acetyl-CoA und Propionyl CoA	76
G. Darstellung von Biotinmethylester	76
H. Proteinbestimmung	76
J. Herstellung und Bestimmung der Beladungskapazität von Avidin-Monomer- Sepharose	77
K. Isolierung der Acetyl-CoA-Carboxylase aus <u>E. coli</u> B	79
1. Biotin Carboxylase	79
2. Carboxyl-Transferase	80
3. Carboxyl Carrier Protein	82
L. Isolierung des Carboxyl Carrier Proteins aus <u>Achromobacter</u> IVS	82

	Seiten
M. Isoelektrische Fokussierung	84
1. präparativ in der Säule	84
2. präparativ in granulierten Flachgelen	85
3. analytisch auf Polyacrylamidgelen	85
N. Polyacrylamidgel-Elektrophoresen	86
1. Disk-Elektrophoresen	86
2. SDS-Elektrophoresen	86
O. Aminosäureanalyse	86
1. Proteinhydrolyse mit HCL	86
2. Proteinhydrolyse mit Methansulfon- säure	87
3. Perameisensäureoxydation	87
4. Fluorimetrische Tryptophanbestimmung	87
P. Herstellung von Antiserum	89
Q. Immun-Diffusion	89
V. Zusammenfassung	90
Literaturverzeichnis	92

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
NADPH	Nicotinsäureamid - Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduziert
CoA	Coenzym A
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
EDTA	Äthylendiamin-Tetraacetat
Tris	2-Hydroxymethyl-2-amino-propan-1,3-diol
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
CCP	Carboxyl Carrier Protein
BC	Biotin-Carboxylase
CT	Carboxyl-Transferase

Zahlen im Index geben das Molekulargewicht an.
Buchstaben im Index bedeuten:
E = aus E.coli, A = aus Achromobacter.
z.B. CCP_{A 11 000} = Carboxyl Carrier Protein aus Achromobacter mit einem Molekulargewicht von 11 000.

PEP	Phosphoenolpyruvat
-----	--------------------

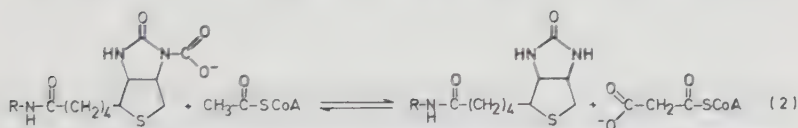
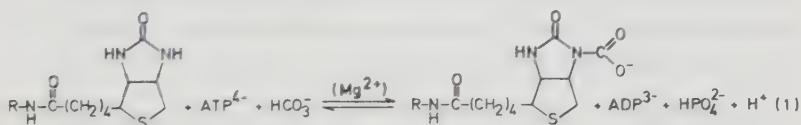
I. EINFÜHRUNG

Der erste Schritt der de novo Biosynthese von Fettsäuren wird durch die Acetyl-CoA-Carboxylase katalysiert. Zumindest in eukaryontischen Organismen stellt sie den Angriffspunkt für die Regulation des gesamten Syntheseweges dar. (1).

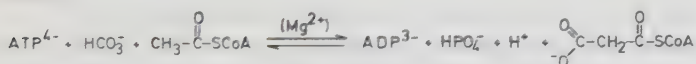
Die Acetyl-CoA-Carboxylase gehört zur Familie der Biotinenzyme. Obwohl Biotin als Wachstumsfaktor für Hefe schon 1936 von Kögl und Tönnes (2) isoliert wurde, gelang es erst Lynen, Knappe und Lorch 1959 (3), den Wirkungsmechanismus des Biotins aufzuklären.

Sie zeigten, daß Biotinenzyme Multienzymsysteme sind, die die Carboxylierung verschiedener Substrate durch die intermediäre Bildung von Carboxybiotin katalysieren.

Die Struktur der Biotinenzyme wurde vor allem in den Laboratorien von Vagelos (4) und von Wood (5-7) an bakteriellen Systemen aufgeklärt. Ihre Untersuchungen bestätigen, daß die Carboxylierungsreaktion als Folge von zwei Teilreaktionen abläuft, wie sie für die Acetyl-CoA-Carboxylierung in Abb. 1 formuliert ist.



Summe:



R-NH₂ : Acetyl-CoA-Carboxylase-Apoenzym

Abb. 1: Reaktionsgleichung der Carboxylierung von Acetyl-CoA durch Acetyl-CoA-Carboxylase

Vagelos (4) isolierte und charakterisierte die für die Teilreaktionen verantwortlichen Enzyme: Die Biotin-Carboxylase katalysiert die Carboxylierung des an ein Träger-Protein gebundenen prosthetischen Biotins. Mit Hilfe der Carboxyl-Transferase findet dann die Übertragung der Carboxylgruppe vom Biotin auf das Akzeptormolekül in diesem Fall Acetyl-CoA statt.

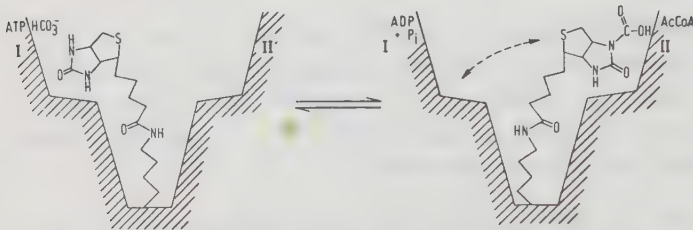


Abb. 2: Transfer der Carboxylgruppe

Die Teilaktivitäten bakterieller Biotinenzyme sind auf verschiedenen Proteinen lokalisiert. So lassen sich die drei nicht identischen Untereinheiten der Acetyl-CoA-Carboxylase aus E. coli getrennt anreichern und zu einem aktiven Enzym rekonstituieren (8).

Die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase aus Achromobacter IVS wird aus zwei Proteinen gebildet, der biotinhaltigen Biotin-carboxylase und einer biotinfreien Untereinheit, vermutlich der Carboxyltransferase (9).

Eukaryontische Systeme aus Hefe, Ratten- und Taubenleber bestehen, soweit untersucht, aus einer Kette, deren drei Komponenten kovalent miteinander verknüpft sind (10).

Pflanzen enthalten ein- wie auch mehrkettige Systeme (11). Wie erwartet, läßt sich die Acetyl-CoA-Carboxylase aus den prokaryontischen Spinatchloroplasten in drei verschiedene Untereinheiten trennen, während das gleiche Enzym aus Weizenkeimen aus zwei Ketten besteht.

Im allgemeinen scheint im Rahmen der Enzymevolution eine Entwicklung begünstigt zu sein, die von Enzym-Systemen aus

unifunktionellen Einzelenzymen zu Multienzym-Komplexen aus größeren multifunktionellen Polypeptiden führt. Möglicherweise wird eine solche Entwicklung durch Genfusion realisiert, wie sie Yourno et al. (12) experimentell gelungen ist.

Die Ähnlichkeit der Mechanismen biotinabhängiger Enzyme wirft die Frage auf, ob verschiedene Biotinenzyme des gleichen prokaryontischen Organismus funktionell gleiche Untereinheiten gemeinsam verwenden. Zum Beispiel erscheint es plausibel, daß die Biotincarboxylase- und Carboxyl Carrier Protein-Untereinheiten der Acetyl-CoA-Carboxylase, Propionyl-CoA-Carboxylase und Pyruvat-Carboxylase in einer Zelle identisch sein könnten. Nur ihre jeweiligen Carboxyltransferasen würden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität unterscheiden.

Im Falle von P.citronellolis konnten Fall et al. (13) diese Frage eindeutig klären. Sie fanden für die Pyruvat-Carboxylase und Acetyl-CoA-Carboxylase zwei verschiedene Carboxyl-Carrier Proteine.

In einer Reihe von anderen Bakterien findet man verschiedenen große Biotinyl-Proteine, die aber bisher nur zum Teil den jeweiligen Enzymen zugeordnet werden konnten. Tab. 1 zeigt eine Reihe dieser Biotinyl-Proteine, deren Molekulargewichte aber nur als Näherungswerte zu betrachten sind.

Tab. 1: Molekulargewichte verschiedener Biotinylproteine

	Acetyl-CoA Carboxylase	Pyruvat- Carboxylase	Trans- Carboxylase	β -MCCoA Carboxylase	nicht zugeordnet
<i>Escherichia coli</i>	22 500				
<i>Enterobacter aerogenes</i>	25 000				90 000
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	25 000	65 000			
<i>Bacillus cereus</i>	20-25000	90 000			
<i>Propionibacterium shermanii</i>			10 000		40 000; 80 000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	20-25000	90 000			
<i>Mycobacterium phlei</i>	55 000				80 000; 25 000
<i>Achromobacter</i> IVS				96 000	10-20000

Schiele (14) fand bei der DEAE-Cellulosechromatographie eines Rohextraktes aus *Achromobacter* IVS, der auf ^{14}C -Biotin und Isovaleriansäure als einziger Kohlenstoffquelle gezüchtet worden war, zwei radioaktive Gipfel.

Der zweite Gipfel war identisch mit der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase, an deren Biotin-Carboxylase-Untereinheit (M_w 96 000) das Biotin kovalent gebunden ist. Der erste Gipfel entsprach einem Biotinylprotein vom Molekulargewicht 10 000.

Nach Überimpfen auf ein biotinfreies Acetat-Minimalmedium verschwand der zweite Gipfel allmählich, während der erste sich im gleichen Maß vergrößerte.

Die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase, die dem Abbau der Isovaleriansäure dient, ist induzierbar. Acetyl-CoA-Carboxylase, andererseits, ist an der Produktion langkettiger

Fettsäuren und damit am Aufbau von Lipidmembranen beteiligt und somit lebenswichtig für die Zelle.

Schiele folgerte aus diesen Experimenten, daß das kleine Biotinylprotein das CCP der Acetyl-CoA-Carboxylase aus Achromobacter IVS darstellt. Jedoch konnte er nicht die Carboxylierung des Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA nachweisen.

Der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase-Komplex besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten. Alle Acetyl-CoA-Carboxylasen, denen ein Biotinprotein vom Molekulargewicht 10 - 20 000 zugeordnet werden kann, sind aber dreikettige Systeme. Träfe die Hypothese eines der Acetyl-CoA-Carboxylase zugehörigen Carriers zu, so existieren also in einer Zelle zwei verschiedene Organisationsformen der Biotinenzyme.

Die Funktion des 10 000-Biotinylproteins aufzuklären ist das Ziel dieser Arbeit.

III. ERGEBNISSE

A. Acetyl-CoA-Carboxylase aus Achromobacter IVS

1. Nachweis der Aktivität

Obwohl Schiele (15) wiederholt versucht hatte, die Acetyl-CoA-Carboxylase Aktivität aus Achromobacter IVS zu bestimmen, gelang der eindeutige Nachweis der Existenz dieses Enzyms erst, als ein radioaktiver Test mit erheblich gesteigerter Empfindlichkeit gegenüber der von Matsuhashi (16) entwickelten optischen Bestimmungsmethode verwendet wurde.

Die enzymatische Carboxylierung von Acetyl-CoA wird durch eine ATP-abhängige Fixierung von radioaktivem Bikarbonat gezeigt. Die Reaktion wird durch Avidin gehemmt. Durch Zusatz von Fettsäuresynthetase aus Hefe und NADPH läßt sich die säurestabile radioaktive Markierung in eine säurelabile überführen (Tab. 2). Der gebildete 3-(^{14}C)-Malonsäurerest wird nämlich in der Kondensationsreaktion der Fettsäurebiosynthese wieder decarboxyliert.

Die spezifische Aktivität der Acetyl-CoA-Carboxylase in Rohextrakten läßt sich nicht durch Zusatz von gereinigtem Carboxyl Carrier Protein (siehe II. B. 1.) steigern. Im Gegensatz dazu erfolgt eine etwa fünf- bis achtfache Steigerung nach Zugabe von angereicherter Biotincarboxylase aus E.coli (Abb. 3). Die erste Teilreaktion der Acetyl-CoA-Carboxylase, d.h. die Carboxylierung des Carboxyl Carrier Proteins, ist also in diesen Extrakten der limitierende Faktor.

Das bei der enzymatischen Fixierung von Bikarbonat gebildete Malonyl-CoA wird nach Verseifung der Reaktionsprodukte dünnschichtchromatographisch nachgewiesen (Abb. 4).

Tab. 2 : Säurestabile Fixierung von $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ in Rohextrakten aus *Achromobacter* IVS

10 g frische Zellen werden in 25 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 im Schloßmann Homogenisator aufgeschlossen. Aliquote (0.19 mg Protein) werden mit den Substraten des radioaktiven Acetyl-CoA-Carboxylase Testes (siehe V.E.1.) 5 min. inkubiert. Die Hälfte der Inkubation wird sofort angesäuert, der anderen Hälfte werden 500 mU FSS und 1 mM NADPH zugegeben; diese wird weitere 5 min. inkubiert und danach erst angesäuert. Die säurestabile Radioaktivität wird nach Trocknen der Proben bestimmt. Die spezifische Radioaktivität des eingesetzten $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ beträgt 55 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$.

Substrat	fixierte Radioaktivität (cpm) ⁺
$\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$	220
$\text{H}^{14}\text{CO}_3^- + \text{ATP}$	210
$\text{H}^{14}\text{CO}_3^- + \text{ATP} + \text{AcCoA}$	5 440
$\text{H}^{14}\text{CO}_3^- + \text{AcCoA}$	630
$\text{H}^{14}\text{CO}_3^- + \text{ATP} + \text{AcCoA} + \text{FSS}$	4 980
$\text{H}^{14}\text{CO}_3^- + \text{ATP} + \text{AcCoA} + \text{FSS} + \text{NADPH}$	320
$\text{H}^{14}\text{CO}_3^- + \text{AcCoA} + \text{FSS} + \text{NADPH}$	620
$\text{H}^{14}\text{CO}_3^- + \text{ATP} + \text{FSS} + \text{NADPH}$	270
$\text{H}^{14}\text{CO}_3^- + \text{ATP} + \text{AcCoA} + \text{Avidin}^*$	440
$\text{H}^{14}\text{CO}_3^- + \text{ATP} + \text{AcCoA} + (\text{Avidin} + \text{Biotin})^{**}$	5 200
$\text{H}^{14}\text{CO}_3^- + \text{ATP} + \text{AcCoA} + \text{Biotin}^{***}$	5 180

+ Mittelwerte aus 4 Bestimmungen

* 0.63 Einheiten Avidin

** 0.63 Einheiten Avidin wurden mit 20 μg Biotin vorinkubiert.

*** 20 μg Biotin

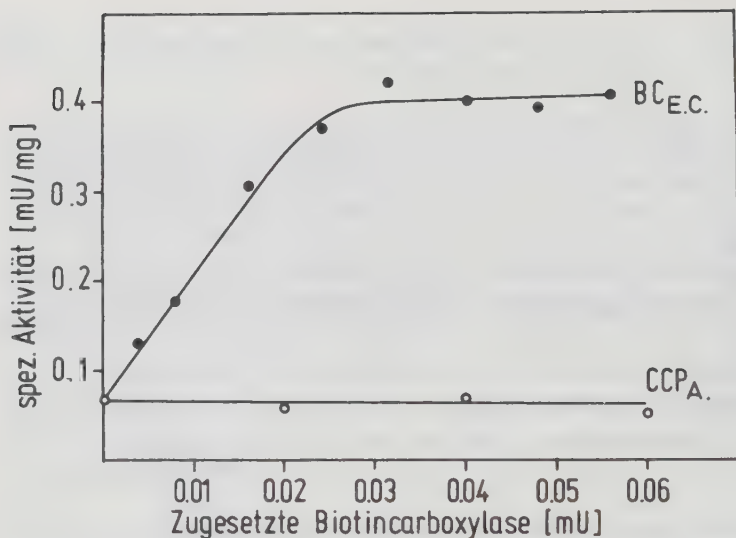


Abb. 3 : Acetyl-CoA-Carboxylase Aktivität nach Zusatz von Biotin-Carboxylase aus E.coli

Einem Rohextrakt (siehe Tab. 2) werden in acht Inkubationsansätzen steigende Mengen von Biotin-Carboxylase aus E.coli zugesetzt. Die Acetyl-CoA-Carboxylase Aktivität wird durch Fixierung von $H^{14}CO_3^-$ bestimmt (●—●). Drei weiteren Inkubationsansätzen werden 55, 110 und 165 pmol Carboxyl Carrier Protein aus Achromobacter zugegeben (○—○)

Daß bei dieser Reaktion Acetyl-CoA als Akzeptor für die Carboxylgruppe dient, wird durch enzymatischen Austausch der Carboxylgruppe zwischen Malonyl-CoA und 2-(^{14}C)-Acetyl-CoA gezeigt. Ohne Zusatz von unmarkiertem Malonyl-CoA wird kein 2-(^{14}C)-Malonyl-CoA gebildet (Tab. 3) Die Austauschreaktion wird nach Matsushashi et al. (16) durchgeführt. 2(^{14}C)-Malonyl-CoA wird durch Papierchromatographie von nicht umgesetztem 2(^{14}C)-Acetyl-CoA getrennt.

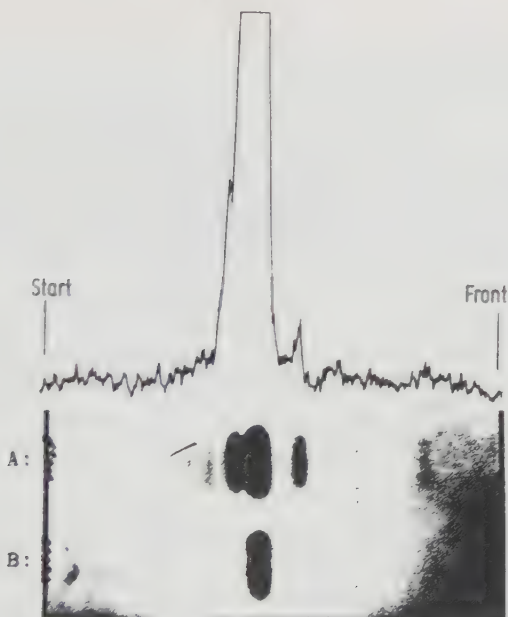


Abb. 4 Nachweis des gebildeten Malonyl-CoA

Ein fünffacher Testansatz zur radioaktiven Bestimmung von Acetyl-CoA-Carboxylase wird 15 min. bei 30° C mit 1.4 mg Prot. Rohextrakt aus *Achromobacter* (siehe Tab. 2) inkubiert. Nach Ansäuern wird nicht fixiertes ^{14}C -Bikarbonat durch Einleiten von CO_2 verblasen und die gebildeten CoA-Verbindungen durch Zusatz von KOH bei pH 10 30 min. bei 50° C verseift. Der Ansatz wird wieder auf pH 2 gebracht und über Nacht mit peroxydfreiem Äther perforiert. Der Äther wird abgezogen, der Rückstand in Äthanol aufgenommen, nicht lösliche Rückstände abzentrifugiert und der Extrakt auf eine Cellulosedünnschichtplatte aufgetragen. Die Chromatographie erfolgt mit Butanol/Pyridin/ H_2O , 1:1:1 (v/v/v) als Laufmittel. Die Verteilung der Reaktionsprodukte wird autoradiographisch bestimmt.

Spur A: Reaktionsprodukte der Inkubation.

Darüber das entsprechende Radiodünnschichtchromatogramm.

Spur B: Authentische 3-(^{14}C)-Malonsäure. Die übrigen Banden, die nicht der Malonsäure entsprechen, wurden nicht identifiziert.

Tab. 3 Austausch der Carboxylgruppe zwischen Malonyl-CoA und 2-(^{14}C)-Acetyl-CoA

2.4 mg Protein eines Rohextraktes (siehe Tab. 2) werden jeweils mit 0.2 mM 2-(^{14}C)-Acetyl-CoA (400 cpm/nmol) und verschiedenen Konzentrationen an Malonyl-CoA 35 min. bei 30° C inkubiert. Nach alkalischer Hydrolyse und Neutralisierung werden die Reaktionsansätze auf 0.8 ml Dowex AG 1 x 8 Säulen aufgesetzt. Essigsäure wird mit 1 N Ameisensäure, Malonsäure mit 4 N Ameisensäure eluiert.

Malonyl-CoA im Testansatz (mM)	2-(^{14}C)-Malonsäure (cpm)
0	210
0.1	1 730
0.2	2 800
0.4	4 040

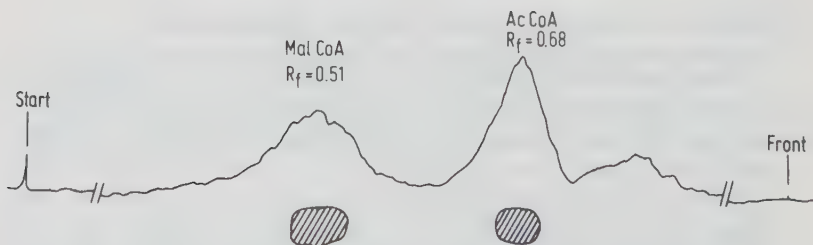


Abb. 5 : Papierchromatographie einer durch Austausch der Carboxylgruppe entstandenen Mischung von 2-(^{14}C)-Acetyl-CoA und 2-(^{14}C)-Malonyl-CoA

Ein Testansatz (siehe Legende zu Tab. 3) wird nach der Inkubation angesäuert. Gefälltes Protein wird abzentrifugiert und die Mischung auf Whatman 3 MM-Papier absteigend chromatographiert.

Laufmittel: Isobuttersäure/ $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3/0.1 \text{ M EDTA pH } 4.5$;
62:37.5:2.5:1 ($v/v/v/v$)

Kurve : Radiopapierchromatogramm der Reaktionsprodukte

Schraffierte Punkte: Authentisches Malonyl-CoA und Acetyl-CoA.

2. Acetyl-CoA-Carboxylase Aktivität unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Aus den Generationszeiten von E. coli B ($T = 20-30$ Min.) und Achromobacter IVS ($T = 210$ Min.) und der spezifischen Acetyl-CoA-Carboxylase Aktivität in zellfreien Extrakten von E. coli B ($2-3$ mU/mg Protein) (8) läßt sich eine theoretische spezifische Aktivität dieses Enzyms in Extrakten von Achromobacter IVS von 0.2 bis 0.5 mU/mg Protein abschätzen. Tatsächlich beträgt die unter Testbedingungen gemessene Aktivität in Rohextrakten von Achromobacter nur 0.05 bis 0.1 mU/mg Protein.

Die für die anfänglichen Untersuchungen verwendeten Zellen waren bis zum Ende der logarithmischen Phase gezüchtet worden. Die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase aus dem gleichen Bakterium ist bei Wachstum auf Isovaleriansäure in dieser Wachstumsphase mit hoher Aktivität vorhanden. Nur über dieses Enzym kann die Kohlenstoffquelle nutzbar gemacht werden (9).

Die Acetyl-CoA-Carboxylase stellt aber, zumindest in der tierischen Zelle, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Fettsäurebiosynthese dar (1). Da Lipide Bestandteil der Struktur der Zelle sind, ist zu erwarten, daß die Acetyl-CoA-Carboxylase Aktivität sich proportional zur Wachstumsgeschwindigkeit der Zelle verhält. Auf Grund der unerwartet niedrigen spezifischen Aktivität der Acetyl-CoA-Carboxylase stellen sich folgende drei Fragen:

- a) Unterliegt die Acetyl-CoA-Carboxylase einer Langzeitregulation, d.h. variiert ihre Aktivität mit der Wachstumsgeschwindigkeit?
- b) Wenn ja, läßt sich die Wachstumsgeschwindigkeit durch Veränderung des Mediums steigern und dadurch auch die spezifische Aktivität der Acetyl-CoA-Carboxylase?
- c) Findet eine schnelle Inaktivierung zwischen Ernte und Aufschluß der Zelle statt?

zu a)

Daß die Aktivität der Acetyl-CoA-Carboxylase im Verlauf einer Züchtung stark variiert, zeigen Untersuchungen, in denen die spezifische Aktivität als Funktion der Wachstumsgeschwindigkeit gemessen wird (Abb. 6).

Es erweist sich als wichtig, die Zellen im ersten Drittel der logarithmischen Phase zu ernten, da die Acetyl-CoA-Carboxylase nur ein schmales Aktivitätsmaximum etwa 24 Stunden nach Animpfen zeigt.

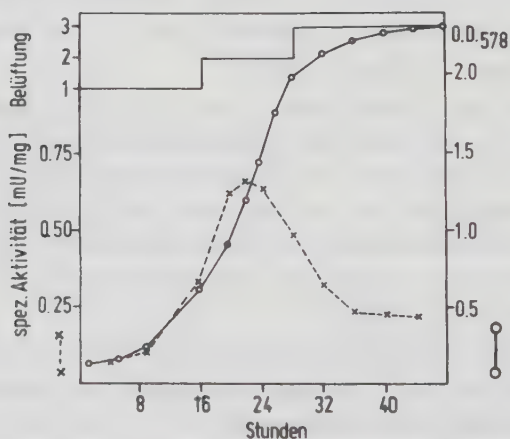


Abb. 6 : Abhängigkeit der spezifischen Acetyl-CoA-Carboxylase Aktivität von der Wachstumsphase

Einer 20 l Belüftungskultur wird in regelmäßigen Zeitabständen 0.2 bis 1 l entnommen. Die Zellen werden abzentrifugiert, sofort aufgeschlossen und getestet.

zu b)

Zusätze von fettsäurefreiem Pepton aus Caseinhydrolysaten sind wirkungslos. Sie bringen keine meßbare Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit.

Obwohl die Zelle Biotin de novo synthetisiert, erfolgt nach Zusatz von Biotin im Medium eine meßbare Verringerung

der Generationszeit von 210 Min. auf 180 Min. (Abb.36 Exp. Teil). Offensichtlich limitiert die Biotin-Syntheseleistung der Zelle ihre Wachstumsrate. In Abb.7 ist die maximale Wachstumsgeschwindigkeit als Funktion der Biotinkonzentration im Medium aufgetragen.

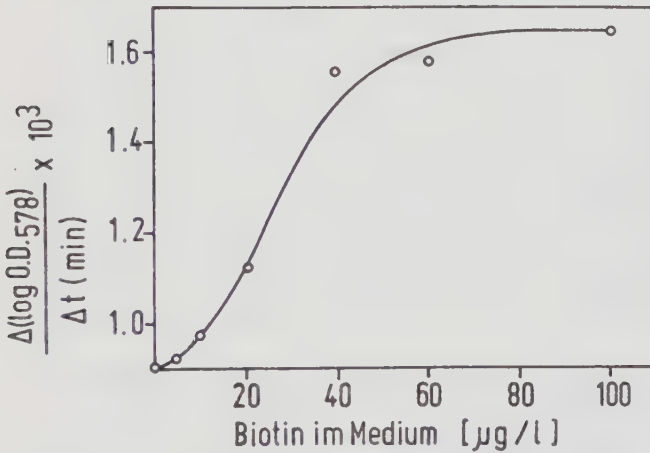


Abb. 7 : Wachstumsgeschwindigkeit bei Zusatz von Biotin im Medium

Die Wachstumskurven von sieben 1 l Schüttelkulturen mit steigenden Zusätzen von Biotin im Medium werden aufgenommen, und die maximale Wachstumsgeschwindigkeit gegen die Biotinkonzentration im Medium aufgetragen.

zu c)

Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Zeit, die zwischen dem Ende der Belüftung und der Ernte vergeht. Lässt man nämlich die Zellen längere Zeit unbelüftet bei Raumtemperatur stehen, so sinkt die spezifische Acetyl-CoA Carboxylase Aktivität bis auf einen Basiswert von etwa 0.1 mU/mg ab. Dieser Abfall ist besonders stark, wenn sich die Zellen in der logarithmischen Phase befinden. Offen-

sichtlich findet nach einer Verzögerung von 0.5 - 1 Stunde eine relativ schnelle Inaktivierung bei sinkendem Sauerstoff-Partialdruck statt. Die Abnahme der Aktivität kann durch schnelles Abkühlen auf etwa 2° C weitgehend verhindert werden.

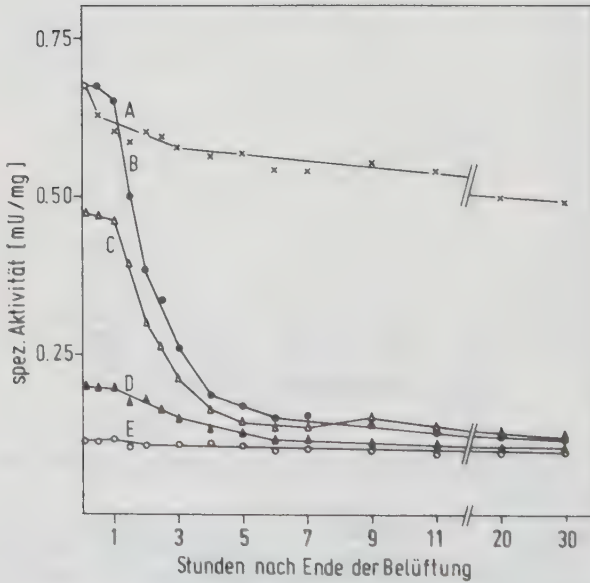


Abb. 8 : Zeitabhängigkeit der spezifischen Aktivität nach Ende der Belüftung

Bei fünf 20 l Belüftungskulturen wird zu verschiedenen Zeiten nach Animpfen die Belüftung gestoppt. Danach werden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen, die Zellen geerntet, aufgeschlossen und sofort getestet.

- | | | | |
|----|---------------------------------|--------|-----------------------|
| A: | Ende der Belüftung bei O.D. 578 | = 1.3, | sofort auf 2° gekühlt |
| B: | " | = 1.3, | bei 30°C inkubiert |
| C: | " | = 0.9, | " |
| D: | " | = 0.5, | " |
| E: | " | = 0.3 | " |

3. Lokalisierung der Acetyl-CoA-Carboxylase Aktivität in der Zelle

Die bisherigen Versuche sind alle mit Extrakten durchgeführt worden, die durch einfaches Aufschließen der Zellen in 0.1 M Phosphatpuffer ohne weitere Reinigungsschritte, gewonnen wurden. Es wurde nämlich beobachtet, daß bei Zentrifugation des Rohextraktes die ^{14}C -Biotin-Radioaktivität und mit ihr die Acetyl-CoA-Carboxylase Aktivität schon bei geringen Beschleunigungen mit den Zellfragmenten sedimentierten. Es soll deshalb untersucht werden, ob die Ionenstärke einen Einfluß auf die Bindung des Biotinylproteins an die Membranfraktion ausübt. Gleichzeitig werden die Biotin-Carboxylase- und Carboxyl-Transferase Aktivitäten gemessen (Abb. 9 a und b).

Während sich die Biotin-Carboxylase im gleichen Maß wie das Carboxyl Carrier Protein von den Zellfragmenten ablösen läßt, bleibt die Carboxyl-Transferase Aktivität bei sinkender Ionenstärke stets zu etwa 60 % mit der Membranfraktion assoziiert.

Da alle Kurven bei 0.1 M Phosphat zusammenlaufen, wird versucht, bei dieser Konzentration eine aktive Membranfraktion zu isolieren.

Aufgetaute und aufgeschlossene Zellen werden auf einem Stufengradienten von 25 - 60 % Sucrose in fünf Fraktionen getrennt (Abb. 10c). Die vier Banden und der Überstand enthalten etwa die gleiche spezifische Radioaktivität (cpm/mg Protein). Die Acetyl-CoA-Carboxylase ist in signifikanter spezifischer Aktivität nur in Bande D vorhanden.

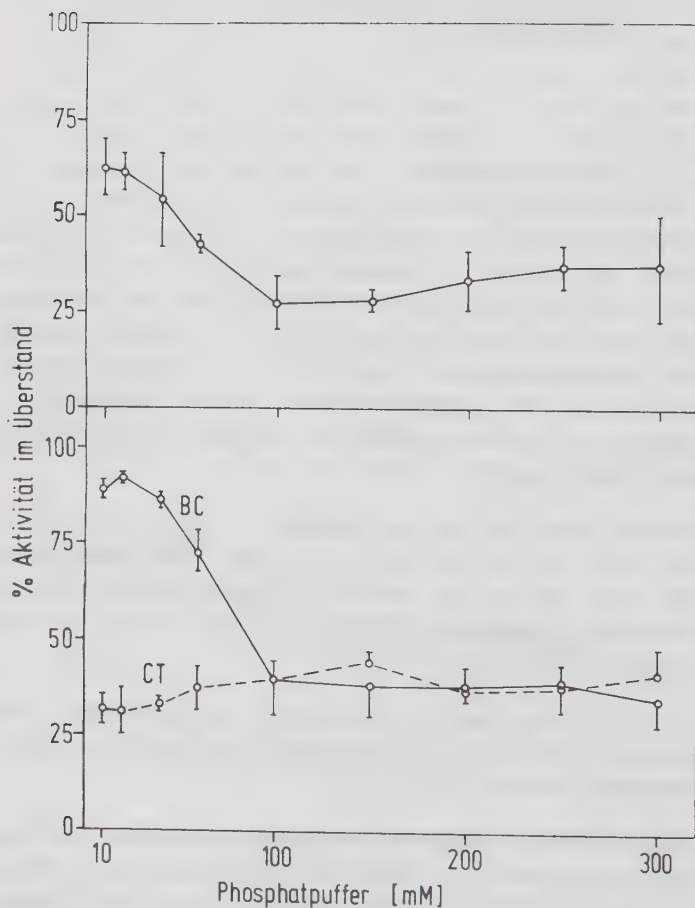


Abb. 9 : Assoziation der Teilenzyme der Acetyl-CoA-Carboxylase mit der Membranfraktion.

Achromobacter IVS-Zellen werden in Phosphatpuffer (pH 7.5) verschiedener Ionenstärken aufgeschlossen. Die Extrakte werden 1 h bei 110 000 g zentrifugiert. Radioaktivität (oben) und enzymatische Teilaktivitäten (unten) werden im Überstand und im Niederschlag bestimmt (Mittelwerte aus 4 bis 8 Bestimmungen).

Zur Identifizierung der vier Banden werden unter gleichen Bedingungen weitere Sedimentationsläufe mit frischen Zellen der logarithmischen und der stationären Wachstumsphase (Abb. 10 a und b) und mit frischen Zellen der log-Phase, die vorher aufgeschlossen worden sind, durchgeführt.

Frische Zellen der log-Phase ergeben nur Bande C. Diese Bande enthält sämtliche Radioaktivität, hat aber keine Acetyl-CoA-Carboxylase Aktivität.

Frische Zellen der Stationären Phase enthalten offensichtlich lysierte Zellen, die bis 55 % Sucrose sedimentieren. Sie haben keine enzymatische Aktivität. Dagegen ist Bande D von frischen, aufgeschlossenen Zellen aktiv. Bande E enthält denaturiertes Protein.

Um die Wechselwirkung der Acetyl-CoA-Carboxylase mit der Membranfraktion weiter zu untersuchen, wird Fraktion D der frischen, aufgeschlossenen Zellen, mit einem Phospholipasengemisch inkubiert.

Abb. 11 zeigt die Abnahme der Teilaktivitäten mit der Zeit. Da die Aktivitäten auch ohne Zusatz der Lipasen stark abnehmen, ist das Ergebnis dieses Versuchs nicht eindeutig. Die Tatsache aber, daß die Carboxyl-Transferase Aktivität schneller abnimmt als die Biotin-Carboxylase Aktivität dürfte ein Hinweis auf die Abhängigkeit der Transferase Reaktion von der Lipid-Matrix sein. Ähnliche Ergebnisse erhielten Foster und McWorther (17) und Heger et al. (18) mit der Acetyl-CoA-Carboxylase aus Rattenleber.

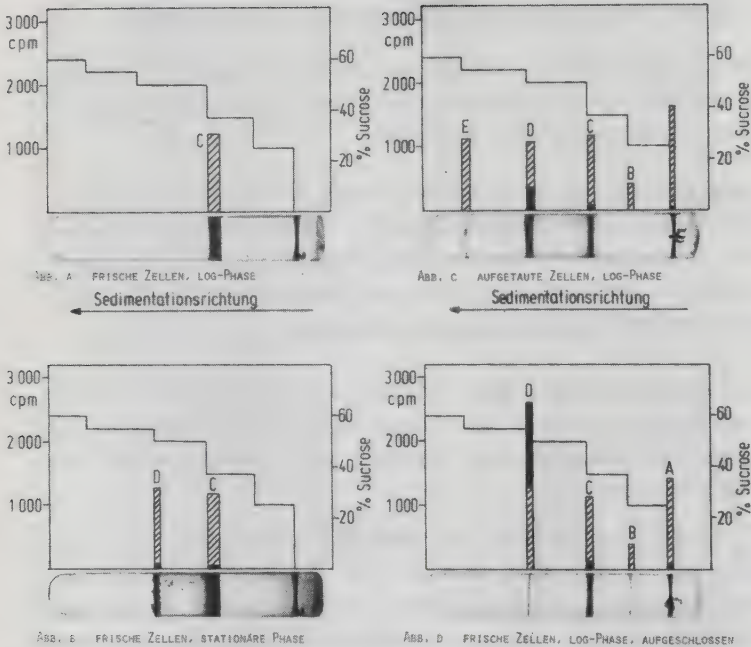


Abb.10 a - d: Sedimentation von *Achromobacter* IVS

0.1 g Zellen (Feuchtgewicht) werden auf Stufengradienten von 25 - 60 % Sucrose in 0.1 M Phosphat pH 7.5 aufgesetzt und 30 Min. bei 39 000 Upm im SW 41 Rotor zentrifugiert. Die Becher werden von unten fraktioniert.

Schraffierte Säulen: ^{14}C -Biotin (cpm/mg Protein)

Schwarze Säulen : Acetyl-CoA-Carboxylase Aktivität
(fixierte cpm/mg Protein x Min.)

Die Abbildungen der Zentrifugenbecher sind unter den Diagrammen abgebildet. Einzelheiten zu diesem Experiment werden im Text erläutert.

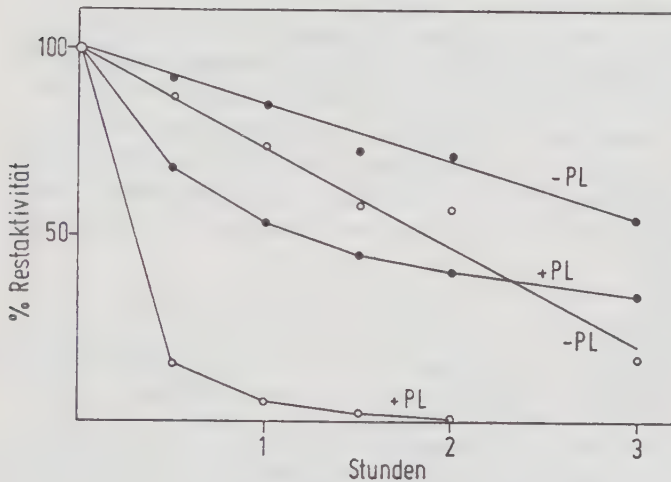


Abb. 11: Abnahme der Biotin-Carboxylase (BC) (●—●) und Carboxyl-Transferase (CT) (○—○) Aktivitäten bei Inkubation mit Phospholipasen (PL)

Die durch Sucrosegredienten-Zentrifugation isolierte Membranfraktion D wird mit 150 mU/ml Phospholipase A und 10 U/ml Phospholipase C inkubiert. Die Referenzinkubation enthält die gleiche Menge an Serumalbumin.

4. Trennung der Teilaktivitäten der Acetyl-CoA-Carboxylase

1968 wurde im Laboratorium von Vagelos (19) und 1970 im Laboratorium von Wood (20) nachgewiesen, daß die Teilaktivitäten der Acetyl-CoA-Carboxylase aus E. coli und der Methylmalonyl-CoA: Pyruvattranscarboxylase aus P. shermanii auf verschiedenen Polypeptidketten liegen. Seither wurde für alle bisher untersuchten bakteriellen Biotinenzyme gezeigt, daß sie aus Komplexen mono- oder bifunktioneller Untereinheiten bestehen, die sich auch präparativ trennen lassen (1).

Schiele (9) gelang es, die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase aus *Achromobacter* in zwei verschiedene Untereinheiten vom Molekulargewicht 96 000 und 78 000 zu spalten. Die größere katalysiert die Carboxylierung von freiem Biotin, enthält aber selber auch proteingebundenes Biotin. Die kleinere Untereinheit besitzt im isolierten Zustand keine enzymatische Aktivität. Das Enzym läßt sich aber nur mit ihr zur aktiven β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase rekonstituieren. Die 78 000 Dalton Polypeptidkette dürfte deshalb im aktiven Komplex den Carboxyl-Transfer katalysieren.

Es ist deshalb von Interesse zu untersuchen, ob

- a) die Acetyl-CoA-Carboxylase aus *Achromobacter* sich in verschiedene Teilenzyme auftrennen läßt und
- b) ob das enzymgebundene Biotin kovalent mit der Biotin-Carboxylase Untereinheit verbunden ist, wie dies für die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase der Fall ist (9).

Erste Hinweise liefert ein Experiment, das zeigt, daß die Biotin-Carboxylase und die Carboxyl-Transferase Aktivität sich bei verschiedenen Ionenstärken von der Membranfraktion ablösen lassen (Abb. 9).

Da aber die proteingebundene Radioaktivität und die Biotin-Carboxylase Aktivität sich bei annähernd gleichen Ionenstärken von den Membranen ablösen lassen und auch in Gel-filtrationsexperimenten zum Teil zusammen eluiert werden, wird versucht, eventuelle Unterschiede der isoelektrischen Punkte auszunützen.

Abb. 12 zeigt, daß die beiden Teilenzyme und die proteingebundene Radioaktivität bei verschiedenen pH-Werten fokussiert werden. Damit ist analytisch gezeigt, daß sich die Acetyl-CoA-Carboxylase aus *Achromobacter* in die für die Gesamtreaktion notwendigen Teilaktivitäten auftrennen läßt. Die Biotin-Carboxylase ist frei von Radioaktivität. Außerdem

geht aus dieser Untersuchung hervor, daß dieser Extrakt aus *Achromobacter* mindestens zwei verschiedene Spezies an Biotinyl-Proteinen enthält.

Die präparative Trennung und Reinigung der Teilenzyme werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

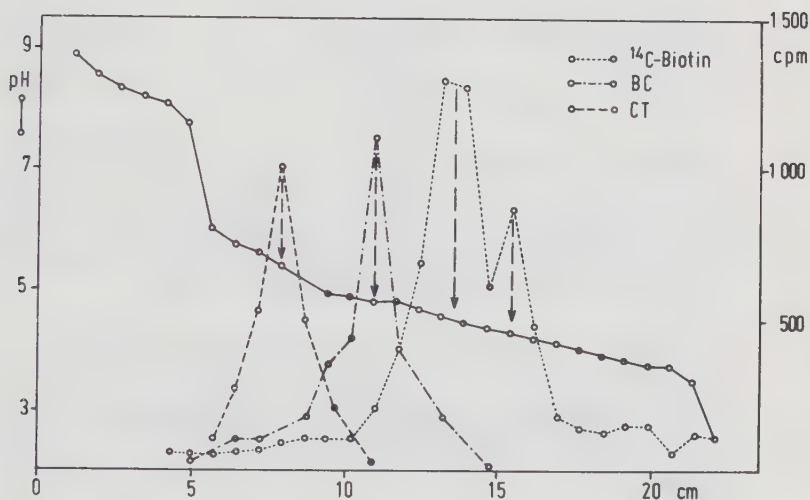


Abb. 12 Isoelektrische Fokussierung eines Rohextraktes in Sephadex G75 superfine.

5 g Bakterien werden in 25 ml 1 % (w/v) Glycin pH 6.1, 5 mM Thioglycol, 5 mM PMSF, 1 mM EDTA aufgeschlossen. Die trübe Suspension wird 16 h mit 1 % (v/v) Empigen BB inkubiert und danach mit H_2O auf 93,5 ml verdünnt. 5 g gewaschenes und getrocknetes Gel und 1.25 ml Ampholine pH 3-5 + 1.25 ml pH 4-6 + 2 ml pH 6-8 + 2 ml pH 7-10 werden zugegeben. Die Suspension wird auf eine 12 x 26 cm Glasplatte mit einem 8 mm hohen Rand gegossen und 18 h bei 8 W und $10^{\circ}C$ fokussiert. Danach werden Gelstreifen quer zum pH-Gradienten ausgekratzt und das Protein mit 50 mM Phosphatpuffer, pH 7.0, 5 mM DTT, 1 mM EDTA aus dem Gel eluiert.

B. Carboxyl Carrier Protein aus Achromobacter IVS

1. Isolierung eines 11 000 Dalton Polypeptids

Zur Anreicherung der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase wird der Rohextrakt aus Achromobacter zunächst einem Geladsorptionsschritt unterworfen. Aus dem ersten Gelüberstand isolierte Schiele (14) ein Biotinylprotein des Molekulargewichts 11 000.

Zunächst wird der Gelüberstand eingeengt. Es folgt eine Acetonfällung bei Raumtemperatur. Das 1.75-fache Volumen an Aceton wird in die Lösung eingerührt und der voluminöse Niederschlag abzentrifugiert.

Nach Chromatographie an Sephadex G75 und DEAE-Cellulose wird die Präparation isoelektrisch fokussiert. Nach diesen Reinigungsschritten erhält man eine Präparation, die in Disk- und SDS-Elektrophoresen nur eine Bande zeigt. Sie entspricht etwa dem Molekulargewicht 11 000.

In Analogie zur Acetyl-CoA-Carboxylase aus E. coli (4) nannte Schiele das gereinigte Biotinylprotein: Biotin Carboxyl Carrier Protein (BCCP). In Tabelle 4 sind die Daten einer Anreicherung nach Schiele (15) zusammengefaßt.

Quantitativ läßt sich das Carboxyl Carrier Protein bestimmen, indem das proteingebundene Biotin stöchiometrisch durch freies $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ mit Hilfe der Biotin-Carboxylase aus E.coli carboxyliert wird (s. Reaktion (2), S. 1, und im Experimentalteil S. 75).

Die Abhängigkeit der fixierten Menge an Bikarbonat von der Menge an Carboxyl Carrier Protein ist bis zu 200 pmol eingesetzte Biotinyläquivalente linear (Abb.23).

Tab. 4 : Anreicherung des Carboxyl Carrier Proteins
($M_w = 11\ 000$) nach Schiele (14). 200 g Bakterien
(Feuchtgewicht) werden eingesetzt

Fraktion	Protein (mg)	Radioakt. (cpm)	Spez.Akt. (cpm/mg)	Anreich. Faktor	Ausbeute %
Überstand d. Geladsorption	13 600	$3.0 \cdot 10^6$	220		100
Acetonfällung	520	$1.56 \cdot 10^6$	3 000	14	52
Chrom. an Sephadex G75	64	$0.87 \cdot 10^6$	13 590	62	29
Chrom an DEAE Zellulose	28	$0.66 \cdot 10^6$	23 570	107	22
Isoelektrische Fokussierung (Spitzenfrak- tion)	1.3*	$0.42 \cdot 10^6$	330 440	1 502	14

* Ermittelt durch Aminosäureanalyse

2. Nachweis eines 22 000 Dalton Polypeptids

1971 berichteten Fall et al. (22), daß das von ihnen aus E. coli isolierte BCCP vom Molekulargewicht 11 000 ein proteolytisches Spaltprodukt eines größeren Biotinylproteins ist. Sie zeigten, daß das native BCCP ein 22 000 Dalton Polypeptid ist und daß das kleinere aus dem größeren durch limitierte Proteolyse mit Subtilisin Carlsberg entsteht (23).

Am Anfang weiterer Untersuchungen steht deshalb die Frage, ob das nach dem Verfahren von Schiele (14) isolierte Carboxyl Carrier Protein auch ein Spaltstück eines größeren Proteins ist.

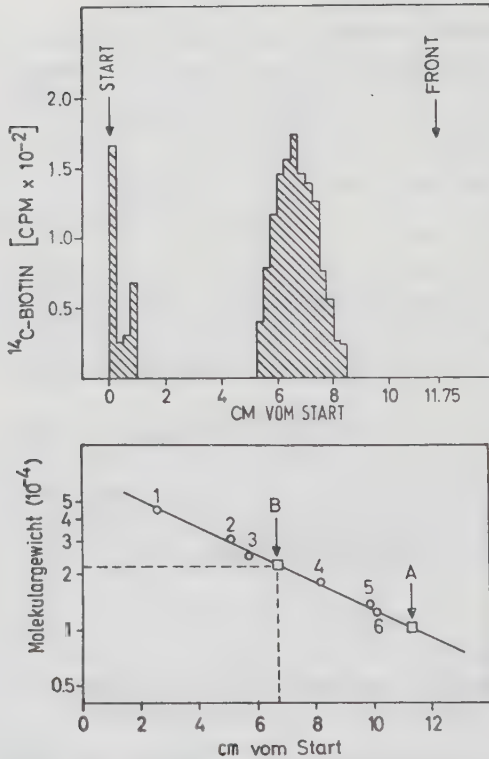


Abb. 13 und 14: SDS-Elektrophorese von solubilisierten Zellen

0.2 g Bakterien werden in 1 ml Puffer suspendiert: die Solubilisierung erfolgt in Gegenwart von 2 % SDS, 640 mM Thioglykol, 8 M Harnstoff, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8 durch zweimal 30 Sekunden Beschallen. 80 μl des Extraktes werden auf Gelröhrchen nach Laemmli in Gegenwart von 6 M Harnstoff aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt 13 h bei 300 V und 4 mA/Röhrchen. Danach wird das Gel geschnitten, die Gelscheibchen 1 h bei 60°C in Soluene inkubiert und die Radioaktivität nach Zusatz von Dimilume bestimmt.

Als Eichproteine werden verwendet (Molekulargewichte in Klammern):

(1) Ovalbumin (45 000), (2) Carboanhydrase (31 000), (3) Chymotrypsinogen (25 000), (4) Avidin (18 000), (5) Lysozym (14 000), (6) Cytochrom c (12 500) und (A) CCP 11 000. (B) entspricht dem radioaktiven Gipfel der oberen Abbildung. Die Radioaktivität am Start wird durch ausgefallenes Protein zwischen Sammel- und Trenngel verursacht.

Um eventuelle Proteolyse beim Aufschluß von *Achromobacter* zu vermeiden, werden Zellen direkt in 2 % SDS durch Beschallung solubilisiert.

Bei der anschließenden Elektrophorese auf SDS-Gelen nach Laemmli (24) erscheint nur eine radioaktive Bande (Abb. 13), die im Bereich zwischen Chymotrypsinogen (25 000 Dalton) und Avidin (18 000 Dalton) liegt (Abb. 14)

Um 11 000 Dalton befindet sich keine Radioaktivität. Man darf deshalb annehmen, daß das von Schiele (14) isolierte Biotinylprotein nicht das native Carboxyl-Carrier Protein ist.

Die Chromatographie des ursprünglichen Gelüberstands an Ultrogel Aca 22 zeigt, daß er erwartungsgemäß auch eine größere Spezies eines radioaktiven Carboxyl Carrier Proteins enthält, wenn auch in relativ geringer Menge (Abb. 14). Andererseits ist nach der Acetonfällung nur noch das 11 000 Dalton Polypeptid vorhanden (Abb. 15). Die geringe relative Ausbeute bei diesem Anreicherungsschritt (50 %, Tab. 4) mag darauf zurückzuführen sein, daß die größere Biotinyl-Spezies bei Zusatz von Aceton ausfällt. Es soll deshalb ein schonenderes Verfahren zur Anreicherung der Biotinylproteine beschrieben werden.

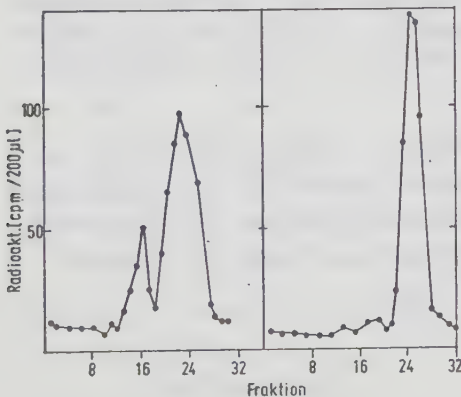


Abb. 14

Abb. 15

Abb. 14 und 15
Gelfiltration von CCP₈-
Präparationen vor (Abb. 14)
und nach (Abb. 15) dem
Gelschritt.
Jeweils 45 mg Protein wur-
den auf eine Aca-22-Säule
(1 x 85 cm) aufgesetzt
und mit 10 mM Phosphat-
puffer pH 7.0, 0.02 %
Na₂ eluiert. 3 ml Frak-
tionen wurden gesammelt
und die Radioaktivität
bestimmt.

3. Isolierung des 22 000 Dalton Polypeptids

Einen eleganten Weg zur Anreicherung von Biotinylproteinen wiesen Lane und seine Mitarbeiter (8). Sie isolierten die Carboxyl Carrier Proteine aus E.coli durch Affinitätschromatographie an Avidin-Sepharose. Da aber die Dissoziationskonstante des tetrameren Avidin-Biotin-Komplexes (A_4 -Biotin $_4$) sehr niedrig ist ($K_{Diss} = 10^{-14}$) (1), während die Affinität des Avidin-Monomers zum Biotin viel geringer ist (1), wird der tetramere Komplex vor der Chromatographie zur Monomer-Avidin-Sepharose gespalten (Darstellung siehe Experimentalteil).

Gebundenes ^{14}C -Biotin läßt sich vom Avidinmonomer zum Teil durch einen Überschuß an "kaltem" Biotin verdrängen. Der Rest läßt sich durch hohe Salzkonzentrationen bei pH 2 abspalten.

Frisch geerntete, auf radioaktivem Biotin gezüchtete, Zellen werden in einem Puffer niedriger Ionenstärke aufgeschlossen. Um die Proteolyse des Carboxyl Carrier Proteins zu verhindern, wird PMSF als Proteasehemmer zugegeben.

Der Rohextrakt wird auf 6 M Guanidinhydrochlorid gebracht, eine Stunde gerührt und danach über Nacht gegen guanidinhydrochlorid-freie Puffer dialysiert. Dieser Reinigungsschritt ist sehr wirkungsvoll; etwa 90 % des Proteins in der Lösung denaturiert während 70 % der Radioaktivität in Lösung bleibt.

Nach Konzentrierung wird die Präparation über Nacht mit der Avidin-Monomer-Sepharose inkubiert. Die Suspension wird anschließend in eine Säule gegossen und die Biotinyl-Proteine mit 6 M Guanidin HCl in 50 mM H_3PO_4 bei pH 2 eluiert (Abb. 16).

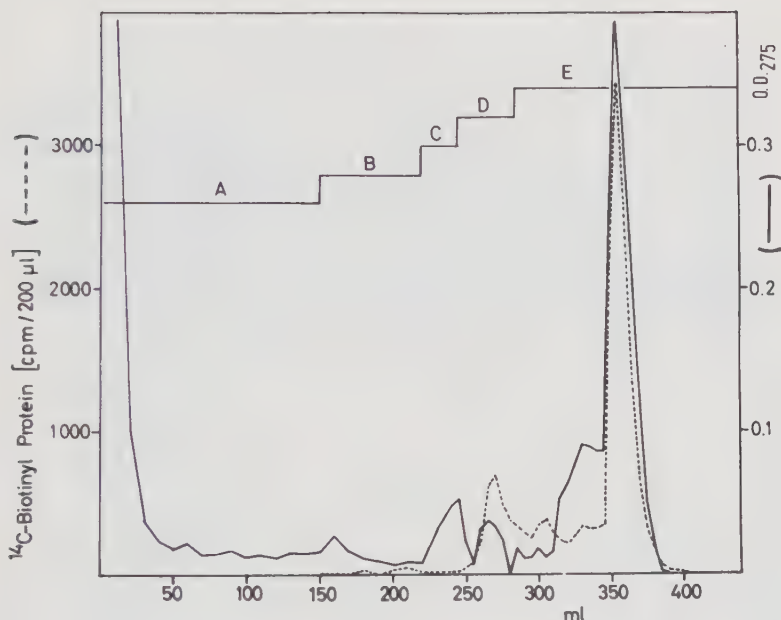


Abb. 16: Affinitätschromatographie an Carboxyl Carrier
Präparation an Avidin-Monomer-Sepharose

Eine durch Guanidin-HCl-Fällung angereicherte CCP-Präparation (0.8 g Protein in 50 ml 0.5 M KCl, 50 mM Phosphat, 0.1 M EDTA, pH 7) wird über Nacht mit 40 ml Monomer-Avidin-Sepharose bei 4° C inkubiert. Anschließend wird das Gel in eine Säule (3.2 x 4.0 cm) gegossen, mit 300 ml H₂O gewaschen und mit folgenden Puffern eluiert:

- A. 150 ml 0.5 M KCl in 50 mM Phosphatpuffer pH 7
- B. 70 ml 0.5 M KCl in 0.2 M Glycin NaOH, pH 9
- C. 25 ml 0.5 M KCl in 0.2 M Glycin NaOH, pH 9 + 10 mM d-Biotin
- D. 50 ml 6 M Guanidin HCl in 50 mM Phosphatpuffer pH 7
- E. 130 ml 6 M Guanidin HCl in 50 mM H₃PO₄ pH 2

Alle Puffer enthalten 1 mM EDTA.

(——) = O.D. 275

(----) = Radioaktivität

Die Fraktionen C, D und E enthalten nur noch eine Mischung zweier Biotinyl-Proteine, die sich analytisch und präparativ durch isoelektrische Fokussierung trennen lassen (Abb. 17). Die Trennung auf SDS-Polyacrylamidgelen zeigt, daß die Mischung etwa 8-10 Gew.-% des 22 000 Dalton Polypeptids enthält. Das zweite Protein ist identisch mit dem von Schiele (14) isolierten Carboxyl Carrier Protein vom Molekulargewicht 11 000 (Abb. 18). Tab. 5 zeigt die Daten einer typischen Anreicherung.

Tab. 5 : Anreicherung der Carboxyl Carrier Proteine aus Achromobacter IVS
200 g Zellen (Feuchtgewicht) werden eingesetzt

Fraktion	Protein (mg)	Radioakt. (cpm)	Spez. Radioakt. (cpm/mg)	Anr. Faktor	Aus- beute %	Biotingehalt* nmol/mg Pro- tein
Zellfreier Extrakt	14 700	$1.94 \cdot 10^6$	132		100	-
80% Ammonium- sulfat	10 200	$1.92 \cdot 10^6$	188	1.4	99	-
6 M GuHCl	1 340	$1.28 \cdot 10^6$	955	7.3	66	0.46
80%Ammonium sulfat	830	$0.95 \cdot 10^6$	1 145	8.8	49	0.55
Affinitäts- Chromatographie						
Frakt. C	0.26	$0.042 \cdot 10^6$	161000	1220	2.2	-
Frakt. D	0.15	$0.030 \cdot 10^6$	200000	1515	1.5	-
Frakt. E	4.21	$0.838 \cdot 10^6$	199000	1507	43.2	96
					46.9	

* Der Biotingehalt wird durch stöchiometrische Carboxylierung
(siehe Experimentaltell) ermittelt.

4. Charakterisierung der Carboxyl Carrier Proteine

Isoelektrische Punkte und Molekulargewichte

Die scheinbaren isoelektrischen Punkte der beiden Carboxyl Carrier Proteine werden durch analytische isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamid-Flachgelen bestimmt.

Abb. 17 Spur C zeigt, daß sie bei pH 4.5 und 4.3 liegen. Dieser Unterschied reicht aus zur präparativen Trennung durch isoelektrische Fokussierung in Sephadex G 75 superfine mit einem stark gespreizten pH Gradienten von 4-6. Die Spuren A und B in Abb. 15 zeigen die getrennten fokussierten Fraktionen.

Die stärker angefärbte Bande in Spur C macht etwa 90 % des aufgesetzten Proteins aus. Sie entspricht auf SDS-Gelen (Abb. 18) etwa einem Molekulargewicht von 11 000. Dies Protein ist also identisch mit dem von Schiele isolierten Carboxyl Carrier Protein.

Die zweite Bande in Spur C (pH 4.3) ist ebenfalls radioaktiv und entspricht etwa 22 000 Dalton. Das Polypeptid dürfte das native sein. Bei keiner der Präparationen wurde ein höherer Anteil als 10 % erhalten. In manchen lag er gerade bei der Nachweisgrenze (1-2 %).

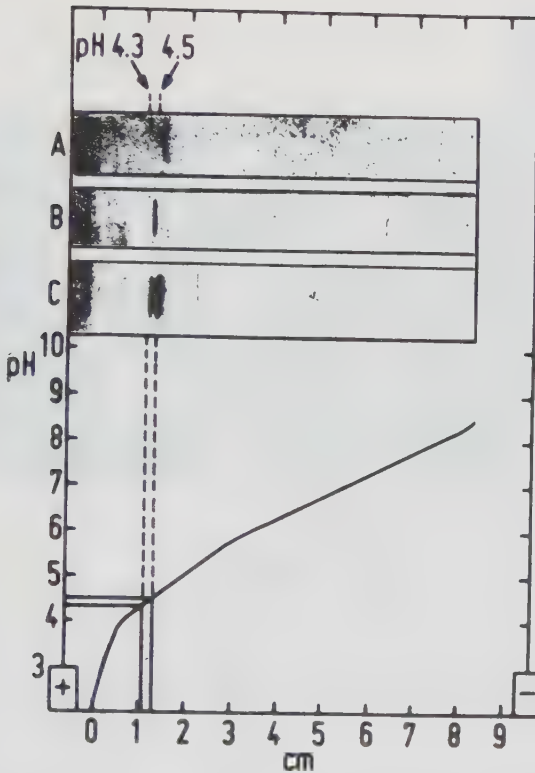


Abb.17: Analytische isoelektrische Fokussierung der Carboxyl Carrier Proteine

10-30 μ g Protein werden nach Dialyse gegen 5 mM Phosphatpuffer pH 7.0 auf PAG-platten pH 3.5 - 10 (LKB) aufgetragen. Die Fokussierung erfolgt 1.5 h bei 11 000 V (8-22 W, 8° C).

A: CCP_{11 000}

B: CCP_{22 000}

C: CCP_{11 000} und CCP_{22 000} vor der präparativen Trennung



Abb.18: SDS-Elektrophorese des Gemischs aus
CCP_{11 000} und CCP_{22 000}

Spalt-puffer und Gele wie beschrieben unter
Abb.13. 3 µg Protein werden 30 Min. in Spalt-
puffer auf 80° C erhitzt und danach aufge-
setzt.

Die Elektrophorese erfolgt 6 h bei 100 V
und 3 mA/Röhrchen

Immunologische Kreuzreaktion

Um Homologien der beiden Carboxyl Carrier Proteine zu
untersuchen, werden gegen CCP_{11 000} Antikörper hergestellt.
Trotz Immunisierung der Kaninchen mit relativ großen Mengen
an Protein (4 x 100 µg) erhält man nach 50 Tagen nur einen
sehr niedrigen Titer. Um deutliche Immun-Präzipitate zu
erhalten, wird die γ-G-Fraktion deshalb viermal konzentriert.

Abb.19 zeigt, daß CCP_{11 000} und CCP_{22 000} gemeinsame antigene
Determinanten besitzen. Wäre gegen CCP_{22 000} immunisiert
worden, sähe man vermutlich auf der Seite des CCP_{11 000}
einen Sporn.

Interessanterweise erhält man auch eine Kreuzreaktion mit aus
E.coli isoliertem Carboxyl Carrier Protein. Auf Grund die-
ses Befundes und der Ähnlichkeit der Aminosäure-Zusammen-
setzung (siehe nächsten Abschnitt) kann man auf eine weit-
gehende Homologie der Primärsequenzen schließen, obwohl die
beiden Biotinyl-Proteine aus verschiedenen Organismen
stammen.

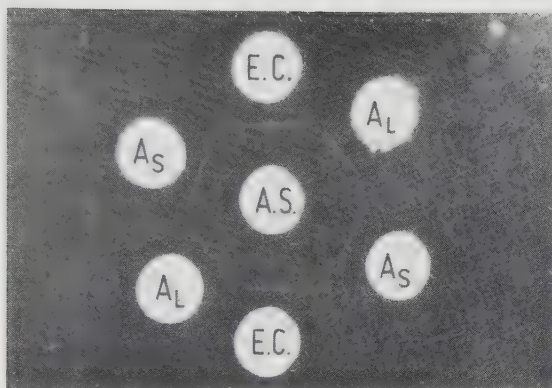


Abb.19 : Kreuzreaktion von CCP_E und CCP_A 22 000 mit Anti- CCP_A 11 000-Serum

AS: Anti CCP_A 11 000-Serum

A_S : CCP_A 11 000

A_L : CCP_A 22 000

E.C.: CCP_E

Daß dabei die gemeinsame antigene Determinante nur das Biotin ist, kann ausgeschlossen werden, da die B Untereinheit der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (= Biotin-Carboxylase + kovalent gebundenes Biotin) nicht mit Anti- $CCP_{11\ 000}$ -IGG kreuzreagiert.

Dies ist insofern auch interessant, weil hierdurch gezeigt wird, daß die beiden Biotin-Enzyme aus Achromobacter nicht nur strukturelle Unterschiede aufweisen, sondern sich auch hinsichtlich der antigenen Determinanten in der Umgebung des Biocytins unterscheiden.

Auf Grund der geringen Ausbeuten bei der Anreicherung des 22 000 Dalton Carboxyl Carrier Proteins werden die folgenden Untersuchungen nur mit dem kleineren (11 000) durchgeführt.

Aminosäureanalyse des Carboxyl Carrier Proteins aus Achromobacter IVS

Zur weiteren Charakterisierung des Carboxyl Carrier Proteins wird eine Aminosäureanalyse durchgeführt. Verwendet wird eine durch präparative isoelektrische Fokussierung gewonnene Präparation.

Die meisten häufig auftretenden Aminosäuren werden bestimmt, nachdem das Enzym mit einem großen Überschuß von 6 N HCl, 0.1 % (v/v) Thioglykol und 0.1 % Phenol 24, 48 und 72 Stunden bei 106° C hydrolysiert worden ist. Die Hydrolysemethode berücksichtigt Vorschläge von Hare (26), Blackburn (27), sowie Tristram und Smith (28). Aminosäureverluste werden nach Blackburn (27) durch Extrapolation der nach verschiedenen Hydrolysezeiten gefundenen Werte auf den Hydrolysebeginn korrigiert. Der mittlere relative Fehler der durch Extrapolation erhaltenen Werte beträgt $\pm 3\%$. Asparagin und Glutamin werden bei dieser Methode zu Asparaginsäure, beziehungsweise Glutaminsäure hydrolysiert und als solche bestimmt. Cystein und Cystin werden nach Oxydation des Proteins mit Perameisensäure und anschließender HCl-Hydrolyse als Cysteinsäure nach Hirs (29) bestimmt. In Wiederfindungsexperimenten wurden 80-84 % des eingesetzten Cysteins als Cysteinsäure nachgewiesen. Die mit dem Carboxyl Carrier Protein gefundenen Werte wurden entsprechend korrigiert. Dabei wird vorausgesetzt, daß freies und proteingebundenes Cystein mit derselben Ausbeute durch Perameisensäure zu Cysteinsäure oxydiert werden.

Da das Carboxyl Carrier Protein nur schwach bei 280 nm absorbiert, vermutete Schiele (14), daß es kein Tryptophan enthält. Um dies näher zu untersuchen, werden zwei Methoden verwendet. Zum ersten wird das Protein mit Methansulfonsäure nach Moore (30) und Simpson et al. (31) hydrolysiert. Wiederfindungsversuche zeigen, daß der Tryptophanverlust unter 10 % liegt. Zum zweiten wird der Tryptophangehalt mit einer fluorimetrischen Methode nach

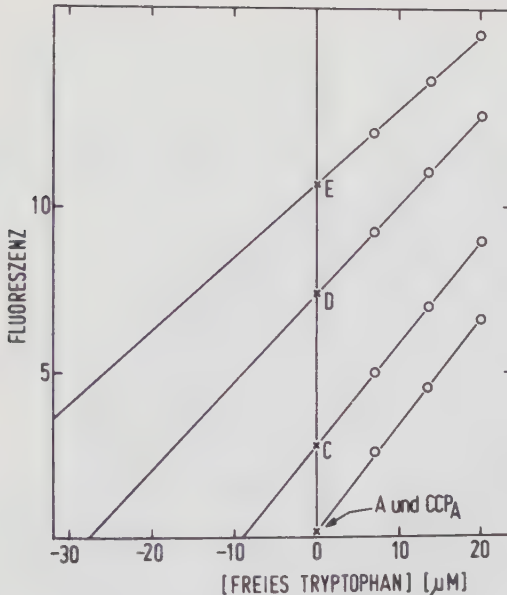


Abb.20: Tryptophangehalt des Carboxyl Carrier Proteins

Eichproteine und das Carboxyl Carrier Protein wurden 30 Min. bei 25° C in 6 M Guanidinhydrochlorid, 30 mM Thioglykol, pH 6.9 inkubiert. Die Fluoreszenz-Küvette enthielt 0.5 ml einer ca. 5 μ M Proteinlösung.

Die interne Kalibrierung wurde erreicht durch dreimaligen Zusatz von jeweils 5 μ l einer 360 μ M Stammlösung an Tryptophan. Die Verdünnung wurde rechnerisch kompensiert.

Aus den Achsenabschnitten der Abszisse wurde graphisch (siehe Experimentalteil, Abb. 41) ein Korrekturfaktor von 1.42 ermittelt.

A: Ribonuclease A

C: Trypsininhibitor aus Sojabohnen

D: Trypsin

E: Lysozym aus Hühnereiweiß

Pajot (32) bestimmt. Hierbei wird eine einheitliche Umgebung aromatischer Chromophore durch 6 M Guanidinhydrochlorid hergestellt. Angeregt wird bei 295 nm und die Emission bei 354 nm gemessen. Abb.20 zeigt eine Titrationsskurve mit freiem Tryptophan und einigen Eichproteinen mit bekanntem Tryptophangehalt. Mit keiner der beiden Methoden kann Tryptophan im CCP_A nachgewiesen werden.

Weitere methodische Einzelheiten sind dem Experimentalteil zu entnehmen.

In Tab. 6 sind die Aminosäuremengen als Äquivalente pro Biotin angegeben. Zum Vergleich sind sie den Aminosäurezusammensetzungen der Carboxyl Carrier Proteine der Acetyl-CoA Carboxylase aus *E. coli* (33) und der Transcarboxylase aus *E.shermanii* (34) gegenübergestellt. Obwohl die Proteine aus *E.coli* (35) und aus *Achromobacter* (siehe oben) proteolytische Artefakte sind, während dasjenige aus *P.shermanii* nach Wood (5) nativ sein soll, sind die Aminosäurezusammensetzungen dieser drei Carrier Proteine auffallend ähnlich. Deshalb ist es nicht verwunderlich, daß das *E.coli* Protein mit Anti-Achromobacter-CCP-Serum kreuzreagiert. (siehe oben).

Weiterhin ist aus der Tabelle zu ersehen, daß sowohl das *E.coli* als auch das *Achromobacter* Protein zu 52 % aus unpolaren Aminosäuren bestehen, während dieser Wert für z.B. die Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hefe nur 40 % ist (36) Oesterhelt et al.(37), fanden für das Membranprotein Rhodopsin aus halophilen Bakterien 51 % unpolare Aminosäuren. Die ATPase aus dem sarkoplasmatischen Reticulum besteht zu 45% aus hydrophoben Aminosäuren (38) . Diese Vergleichswerte zeigen, daß eine hohe Affinität der Carboxyl Carrier Proteine zur cytoplasmatischen Membran wahrscheinlich ist.

Tab. 6 : Aminosäurezusammensetzung des *Achromobacter* Carboxyl Carrier Proteins vom Molekulargewicht 11400

Die Aminosäureanalyse erfolgt nach 24, 48 und 72 h Hydrolyse mit 4 N Methansulfonsäure, 0.2 % Tryptamin. Die erhaltenen Werte wurden auf den Hydrolysebeginn extrapoliert. Cystein wurde nach Perameisensäureoxydation und Hydrolyse mit 6 N HCl, 0.1 % (v/v) Thioglykol und 0.1 % Phenol als Cysteinsäure bestimmt. Die Tryptophanbestimmung erfolgte fluorimetrisch. Näheres siehe Text.

AMINOSÄURE	ACHROMOBACTER IVS	E. COLI	P. SHERMANII
	ACETYL CoA CARBOXYLASE ₁₁₄₀₀	ACETYL CoA CARBOXYLASE BCCP ₁₀₄₀₀	METHYLMALONYL CoA OXALACETAT TRANSCARBOXYLASE
MOL AMINOSÄURE/MOL BIOTIN			
ASPARAGINSÄURE	5	6	8
THREONIN	5	5	5
SERIN	4	6	4
GLUTAMINSÄURE	14	13	8
PROLIN	11	8	12
GLYCIN	11	6	11
ALANIN	17	12	9
CYSTEIN	1	1	1
VALIN	12	12	9
METHIONIN	1	5	2
ISOLEUCIN	4	7	5
LEUCIN	6	3	6
TYROSIN	2	1	2
PHENYLALANIN	3	3	3
LYSIN	5	5	8
HISTIDIN	1	1	2
TRYPTOPHAN	0	0	0
ARGININ	2	2	2
	104	96	97

Titrierung der freien SH-Gruppe mit DTNB

Aus Tab.6 geht hervor, daß das Carboxyl Carrier Protein ein Cystein enthält. Jedoch hat Jodacetamid in Konzentrationen bis 10 mM keinen Einfluß auf die enzymatische Aktivität. Nach Dialyse gegen Jodacetamid-freien Puffer erhält man die gesamte Ausgangsaktivität.

Daß die SH-Gruppe im Protein geschützt sein muß, zeigen Titrierungen mit DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoat)). Erst wenn das Protein mit 6 M Guanidinhydrochlorid oder 8 M Harnstoff denaturiert wird, läßt es sich beladen. SDS ist in dieser Reaktion ein vergleichsweise schwaches Denaturierungsmittel (Abb.22). Diese Tatsache erklärt auch die Beobachtung von Schiele (14), daß das Carboxyl Carrier Protein erst nach Kochen in SDS oder nach vorherigem Umsetzen mit Cyanat die erwartete Wanderungsgeschwindigkeit in SDS-Gelelektrophorese zeigt.

Bei Reaktionsende sind 0.91 - 0.97 Mol -SH pro Mol Protein umgesetzt. Unter diesen Bedingungen ist auch keine enzymatische Aktivität mehr vorhanden.

Die Denaturierung mit Guanidinhydrochlorid und die Oxydation sind reversibel. Nach Entfernen des Salzes durch Dialyse und Reduktion mit Dithiothreitol (DTT) kehrt die Aktivität zu 65 - 90 % zurück (Abb.22).

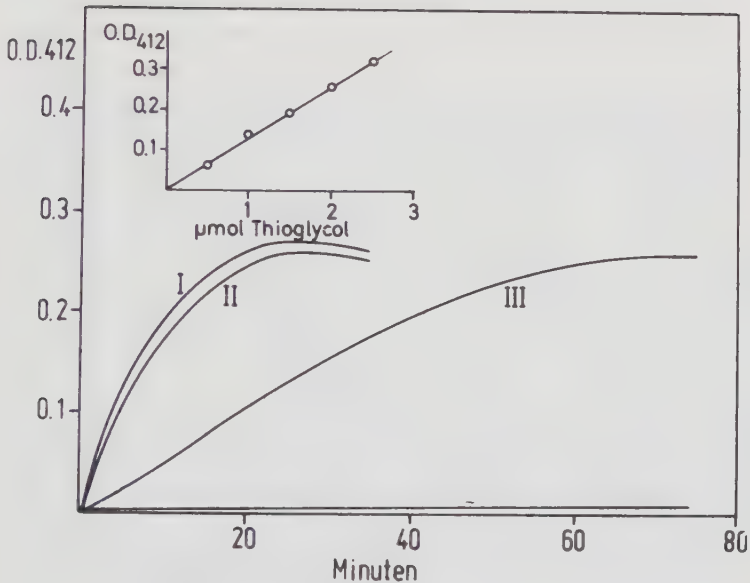


Abb.21: Titrierung der SH-Gruppe des Carboxyl Carrier Proteins mit DTNB (39 , 40)

2,2 nmol CCP₁₁ 000 in 100 μl 50 mM Phosphatpuffer pH 7.0 werden mit 0.1 mM DTNB umgesetzt. Die 1 ml Küvetten enthalten :

- I: 8 M Harnstoff
- II: 6 M Guanidinhydrochlorid
- III: 1 % SDS

Die Extinktionsänderung wird im Cary-Spektralphotometer gemessen.

Oben links: Eichkurve mit Thioglykol.

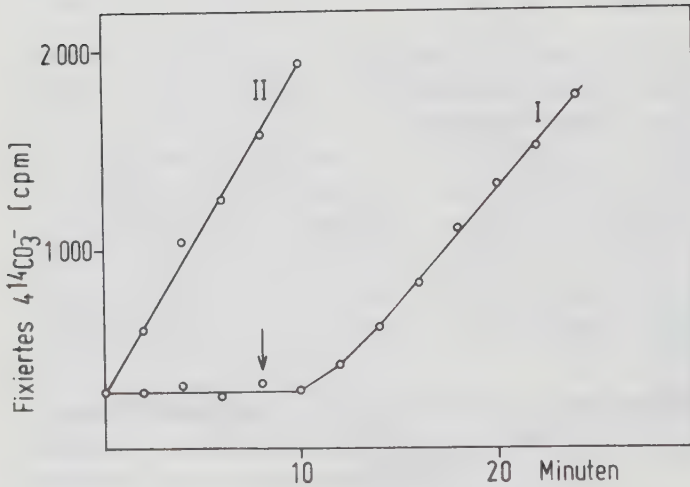


Abb. 22: Renaturierung von oxydiertem Carboxyl Carrier Protein

I: 2.6 nmol CCP werden in 6 M Guanidin HCl mit 0.1 mM DTNB umgesetzt. Nach 10 h Dialyse gegen 50 mM Phosphatpuffer pH 7.0 wird die enzymatische Aktivität von 20 pmol Aliquoten durch Zusatz von 10 mU BC_P und 22 mU CT_E im radioaktiven Acetyl-CoA-Carboxylase-Test bestimmt. Nach 8 Minuten (Pfeil) wird 10 mM DTT zugesetzt.

II: Unbeladenes, natives CCP.

5. Enzymatische Aktivität des Carboxyl Carrier Proteins

Die enzymatische Aktivität des CCP_{11 000} wird durch Carboxylierung des Biotinyl-Proteins und Übertragung der Carboxylgruppe vom enzymgebundenen Biotin auf den Akzeptor Acetyl-CoA nachgewiesen.

Wird das Carboxyl Carrier Protein in Gegenwart von $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$, ATP und Mg^{2+} mit der Biotin-Carboxylase aus E. coli inkubiert, so ist die fixierte Radioaktivität eine lineare Funktion der eingesetzten Menge an Carboxyl Carrier Protein im Bereich von 20 bis 400 pmol.

Aus Kurve (I) in Abb. 23 geht hervor, daß die Konzentration des CCP_{11 000} in der verwendeten Präparation 10.9 μM ist. Aus der Aminosäureanalyse der gleichen Präparation errechnet sich eine Konzentration von 0.138 mg Protein/ml bzw. 12.2 μM bei einem Molekulargewicht von 11 300. Der stöchiometrische Carboxylierungstest liefert also Werte, die rund 10 % zu niedrig liegen. Die nach dieser Methode erhaltenen Werte werden deshalb mit dem Faktor 1.1 multipliziert. Der niedrigere Wert bei der stöchiometrischen Carboxylierung ist auf eine langsame Decarboxylierung zurückzuführen, die beim Verblasen des überschüssigen Bikarbonats durch CO_2 stattfindet (s. Abb. 36).

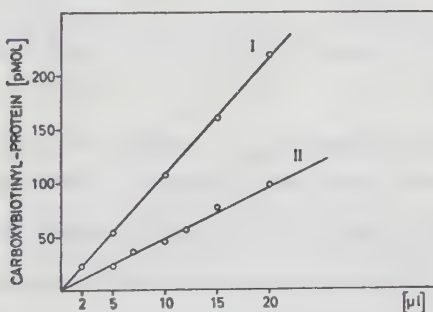


Abb. 23: Stöchiometrische Carboxylierung von Carboxyl Carrier Protein. Abhängigkeit von der eingesetzten Menge.

Biotinyl-Protein-Präparationen werden unter den Bedingungen des stöchiometrischen Carboxylierungstestes inkubiert. (siehe Experimentaltteil)

I : CCP_{11 000} aus Acromobacter

II : CCP_{22 500} aus E. coli B

Zur Übertragung der Carboxylgruppe vom CCP auf Acetyl-CoA wird nach Carboxylierung das nicht fixierte radioaktive Bikarbonat mit CO_2 bei 0°C verblasen; das Carboxy-Biotinyl-Protein wird von der Biotin-Carboxylase und von ATP über eine kurze Sephadex G 75 Säule getrennt. Danach wird das $^{14}\text{CO}_2^-$ - CCP mit Carboxyl-Transferase aus *E.coli* inkubiert und die säurestabile Radioaktivität nach Ende der Inkubation bestimmt. Die Trennung von der Biotincarboxylase ist notwendig, um die Rückreaktion auszuschalten. Während des Verblasens und der Trennung ist sie auf Grund der niedrigen Temperatur zu vernachlässigen. Tab.7 zeigt die Daten eines solchen Versuchs.

Tab. 7 : Übertragung der Carboxylgruppe vom CCP auf Acetyl-CoA

220 pmol CCP, 11 000 werden, wie im Experimentalteil beschrieben, carboxyliert. Nach Verblasen des freien $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ und Abtrennen der Biotin-Carboxylase (BC) über eine 2 ml Sephadex G75 Säule wird das gebildete $^{14}\text{CO}_2^-$ - CCP mit 10 mU Carboxyl-Transferase (CT) und 0.6 mM Acetyl-CoA 10 Min. bei 30°C inkubiert. Der Ansatz wird angesäuert und getrocknet. Radioaktivität im Rückstand wird ausgezählt.

Substrat	$^{14}\text{CO}_2^-$ - BCCP (cpm)	säurestabile Radioaktiv. (cpm)
$\text{H}^{14}\text{CO}_3^- + \text{ATP} \xrightarrow{\text{BC}}$	3990	$+ \text{AcCoA} \xrightarrow{\text{CT}} 3440$
$\text{H}^{14}\text{CO}_3^- + \text{ATP} \xrightarrow{\text{BC}}$	4010	$\xrightarrow{\text{CT}} 130$
$\text{H}^{14}\text{CO}_3^- \xrightarrow{\text{BC}}$	440	$+ \text{AcCoA} \xrightarrow{\text{CT}} < 20$
$\text{H}^{14}\text{CO}_3^- + \text{ATP} \longrightarrow$	160	$+ \text{AcCoA} \xrightarrow{\text{CT}} < 20$
$\text{H}^{14}\text{CO}_3^- + \text{ATP} \xrightarrow{\text{BC}}$	3870	$+ \text{AcCoA} \longrightarrow < 20$

Um ein Maß zu erhalten für die Reaktivität des Carboxyl Carrier Proteins aus *Achromobacter* in diesem "Hybridenzym" aus *E. coli* und *Achromobacter* Untereinheiten, werden die Michaeliskonstanten für das CCP als Substrat in beiden Teil-

reaktionen bestimmt. Zum Vergleich ist in Abb.24 die Kurve des "nativen" E. coli Carboxyl Carrier Proteins eingetragen.

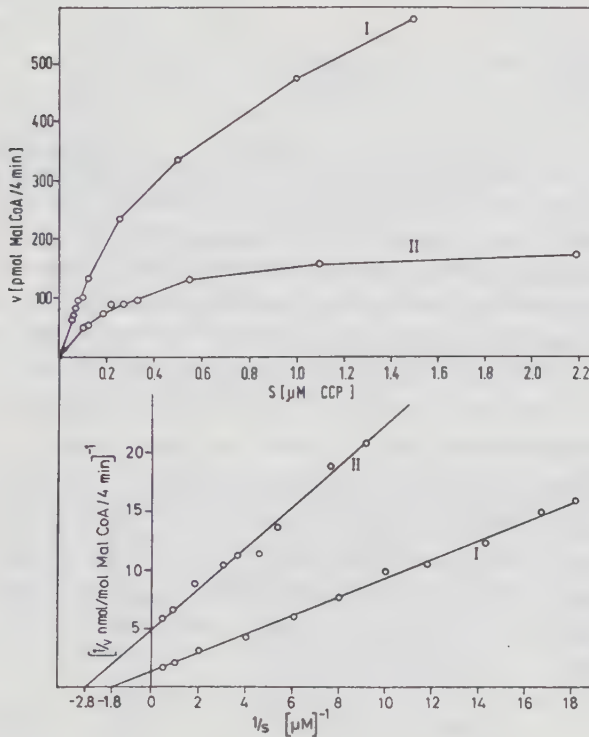


Abb.24: K_M -Wert des CCP_{11 000} aus Achromobacter in der E. coli Carboxyl Transferase Reaktion (II)

CCP_{11 000} wird unter den Bedingungen des radioaktiven Acetyl-CoA-Carboxylase Testes mit 40 mU BCP_E und 4 mU CTP_E inkubiert. Zum Vergleich wird die gleiche Meßserie mit CCP_E aus E. coli durchgeführt (I).

Der K_M -Wert des CCP_A in der Carboxyl-Transferase Reaktion beträgt 4×10^{-7} , liegt also in der gleichen Größenordnung wie derjenige des CCP aus E. coli (4×10^{-7} M nach Fall et al. (22); hier: 6×10^{-7} M). Allerdings liegt V_{max} zwei Drittel niedriger. Dies ist möglicherweise durch

eine geringere "Passform" der CCP am fremden Enzym zu erklären.

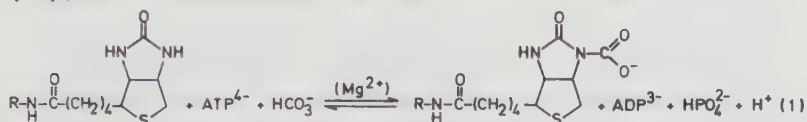
Der K_M -Wert des CCP_A in der Biotin-Carboxylase Reaktion ist 3×10^{-7} (E. coli: 2×10^{-7} (22)). Hier ist V_{max} nur rund ein Zehntel der maximalen Geschwindigkeit des CCP aus E.coli. (Die entsprechenden Kurven sind nicht abgebildet).

Diese Versuche zeigen, daß ein Austausch von Teilenzymen verschiedener Organismen der gleichen Entwicklungsstufe durchaus möglich ist, wenn auch unter teilweise Verlust der Reaktionsgeschwindigkeit. Das einzige publizierte Experiment dieser Art bei Biotinenzymen wurde von Fall et al. (13) ausgeführt. Sie berichten, daß ein Carboxyl Carrier Protein aus Pseudomonas citronellolis mit der Biotin-Carboxylase und der Carboxyl-Transferase aus E.coli eine aktive Acetyl-CoA-Carboxylase ergab. Genauere Daten wurden aber nicht mitgeteilt.

An dieser Stelle ist zu bemerken, daß Versuche, die Untereinheiten B der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase aus Achromobacter mit der Carboxyl-Transferase aus E.coli zu einem aktiven Enzym zu rekonstituieren, fehlschlagen. Auch nach Zusatz von CCP aus Achromobacter konnte keine Aktivität gemessen werden.

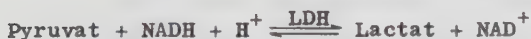
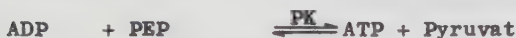
C. Biotin-Carboxylase aus Achromobacter IVS

Die Biotin-Carboxylase (BC) katalysiert folgende Reaktion (51):



Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität können drei verschiedene Methoden verwendet werden:

1. Die Biotincarboxylase wird mit freiem Biotin, ATP und $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ inkubiert. Nach 10 Minuten wird die Reaktion durch Verdünnen mit eiskaltem Wasser abgestoppt und nicht fixiertes $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ durch Einleiten von CO_2 verdrängt. Die in Form von Carboxy-Biotin gebundene Radioaktivität wird bestimmt.
2. Optisch kann die Biotin-Carboxylase-Aktivität bestimmt werden durch Koppelung der NADH-Oxydation über die Pyruvatkinase und Lactat-Dehydrogenase-Reaktionen an die d-Biotin abhängige Bildung von ADP:



Diese Methode kann nur zur Bestimmung der Aktivität in gereinigten Präparationen (nach dem Gelschritt) verwendet werden, da Rohextrakte einen starken Blindlauf verursachen.

Beide Bestimmungsmethoden zeigen lineare Abhängigkeiten von Zeit und Enzymmenge unter den im experimentellen Teil beschriebenen Bedingungen.

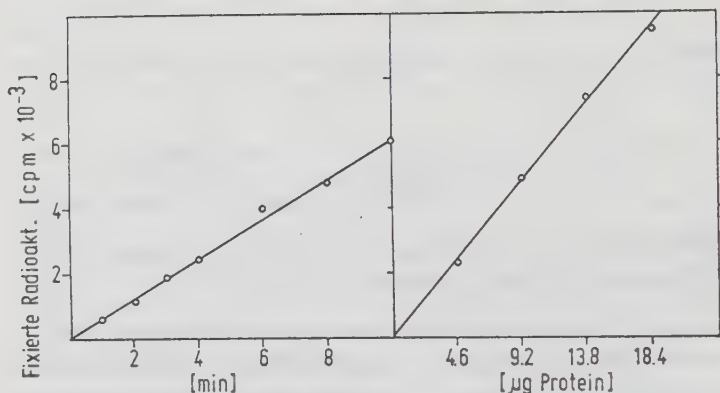


Abb. 25: Abhängigkeit der $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung von Zeit und Enzymmenge bei der radioaktiven Bestimmung der BC-Aktivität

Die Zeitabhängigkeit wird erhalten, indem einem größeren Ansatz zur radioaktiven Bestimmung der Biotin-Carboxylase zu verschiedenen Zeiten Aliquote (= 1.2 mU) entnommen werden.

Zur Bestimmung der Enzymabhängigkeit werden die gleichen Bestimmungen mit steigenden Mengen an Protein der DEAE-Sephadex-Fraktion durchgeführt.

3. Schließlich kann die Biotin-Carboxylase-Aktivität bestimmt werden, indem das Enzym mit einem Überschuß an Carboxyl-Transferase aus *E.coli*, einer definierten Menge an Carboxyl Carrier Protein aus *Achromobacter* und den Substraten der radioaktiven Methode zur Bestimmung der Acetyl-CoA-Carboxylase inkubiert wird (siehe Experimentalteil). Die fixierte Radioaktivität im Malonyl-CoA ist auch hier eine lineare Funktion von Zeit und Enzymmenge; zusammen mit dem Carboxyl-Carrier Protein aus *Achromobacter* und der Carboxyl-Transferase aus *E.coli* zeigt die Biotin-Carboxylase im Acetyl-CoA-Carboxylase-Test nur rund die Hälfte

der Aktivität, die mit dem radioaktiven oder optischen Biotin-Carboxylase-Test gemessen wird.

Die K_M -Wert-Bestimmung mit dem Carboxyl Carrier Protein als Substrat der angereicherten Biotin-Carboxylase zeigt, daß bei etwa 5×10^{-7} M CCP_A die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erzielt wird. Der Unterschied zwischen den Bestimmungsmethoden erklärt sich deshalb aus der Tatsache, daß das Carboxyl Carrier Protein im Acetyl-CoA-Carboxylase-Tests in einer Konzentration von $0.6 \mu\text{M}$ eingesetzt wird (Abb. 26 und 27).

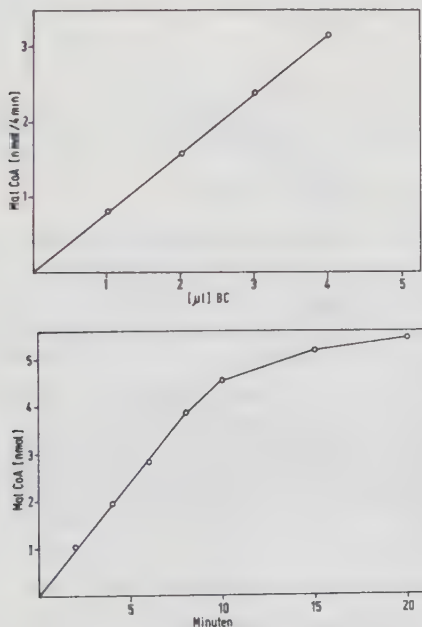


Abb. 26 : Abhängigkeit der Malonyl-CoA-Bildung von Zeit und Enzymmenge

Oben: Die DEAE-Sephadex-Fraktion wird mit Carboxyl-Transferase aus *E. coli* (20 mU) und 100 pmol Carboxyl Carrier Protein aus *Achromobacter* im radioaktiven Acetyl-CoA-Carboxylase-Test inkubiert.

Unten: 11.5 mU Biotin-Carboxylase der DEAE-Sephadex-Fraktion, 0.94 nmol $CCP_{11\ 000}$ und 200 mU Carboxyl-Transferase aus *E. coli* werden in einem 10-fachen Testansatz inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten werden 100 μl Aliquote ($=1.15$ mU BC_A) entnommen, angesäuert und ausgezählt.

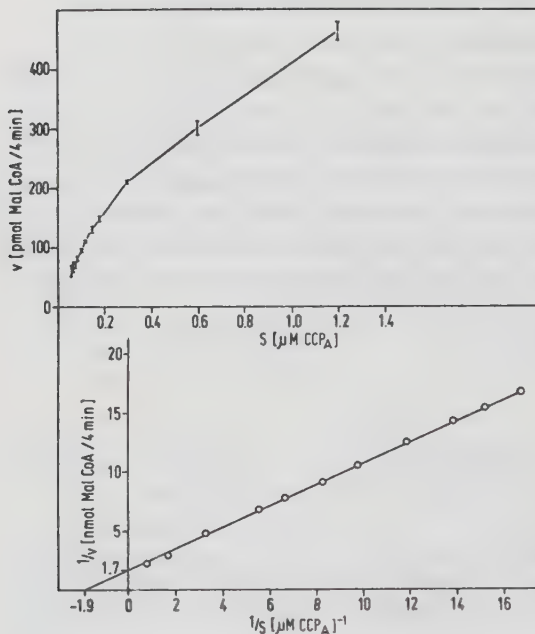


Abb. 27: K_M -Wert des $CCP_{11\ 000}$ aus Achromobacter in der
Achromobacter Biotin-Carboxylase Reaktion

$CCP_{11\ 000}$ wird unter den Bedingungen des radioaktiven
Acetyl-CoA-Carboxylase-Testes mit 0.135 mU Biotin-Carboxylase aus Achromobacter und 10 mU Carboxyl Transferase aus E.coli inkubiert

Anreicherung der Biotin-Carboxylase

Im Gegensatz zur Carboxyl-Transferase (siehe nächstes Kapitel) ist die Biotin-Carboxylase in Rohextrakten bei Raumtemperatur relativ stabil. Deshalb muß bei der Anreicherung nicht besonders auf niedrige Temperaturen geachtet werden (Abb. 28).

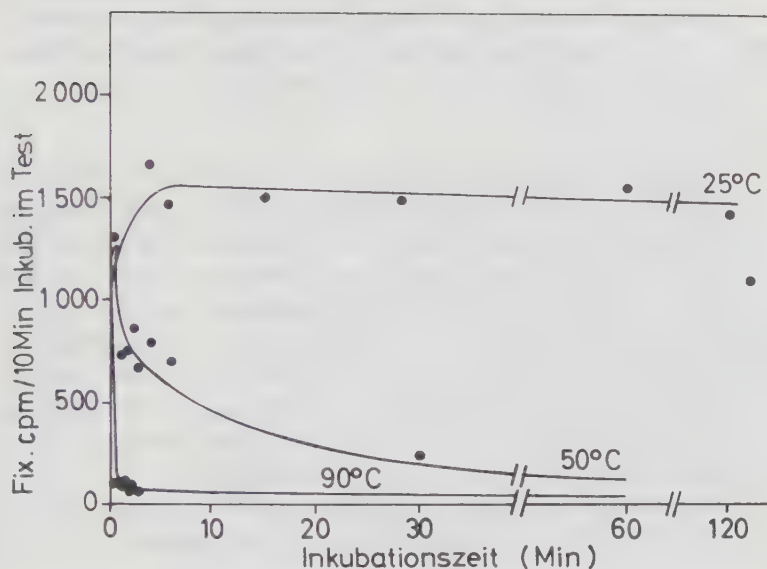


Abb.28: Temperaturbeständigkeit der Biotin-Carboxylase
im Rohextrakt

Drei zehnfachen Biotin-Carboxylase Testansätzen (3 x 10 mg Protein) werden zu verschiedenen Zeiten 500 µl entnommen. Weitere Einzelheiten siehe Experimentalteil.

200 g frische Zellen der logarithmischen Wachstumsphase werden in 500 ml 10 mM Na_2HPO_4 , 5 mM Thioglykol, 5 mM PMSF und 1 mM EDTA suspendiert mit 1 ml n-Oktanol versetzt und in Portionen um 150 ml mit 300 g Glasperlen (31/10) im Schlossmann-Homogenisator 3 Minuten aufgeschlossen. Die Glasperlen werden abfiltriert; die Suspension wird eine Stunde bei 78 000 g zentrifugiert und der Überstand mit Phosphatpuffer auf 13.5 mM Phosphat pH 6 und eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml gebracht.

Ca-Phosphatgel wird im Verhältnis 4 mg Gel zu 1 mg Protein zugegeben, der pH mit Essigsäure auf 6.0 eingestellt und die Suspension anschließend noch zehn Minuten gerührt. Danach wird das Gel abzentrifugiert. Der Überstand enthält

weniger als 10 % der Biotin-Carboxylase Aktivität. Das Gel wird zweimal mit 100 mM Phosphatpuffer gewaschen und die Überstände verworfen. Die Biotin-Carboxylase wird mit zweimal 600 ml 180 mM Phosphatpuffer pH 7.0 vom Gel desorbiert.

Die Eluate werden vereinigt und die Biotin-Carboxylase durch Zusatz von Ammoniumsulfat gefällt. Nach Zentrifugation wird der Niederschlag in 25 mM Phosphatpuffer pH 7.0 aufgenommen, gegen den gleichen Puffer dialysiert und auf eine 50 ml DEAE-Sephadex-Säule gepumpt. Die Biotin-Carboxylase-Aktivität wird mit einem linearen Phosphat-Gradienten von 25 bis 300 mM, pH 7.0, bei etwa 160 mM eluiert (Abb.24). Die aktiven Fraktionen werden entweder durch Fällung mit Ammoniumsulfat (55 %) oder durch Ultrafiltration konzentriert. Alle Pufferlösungen, außer dem Aufschlußpuffer, enthalten 5 mM Thioglycol, 1 mM EDTA und 20 % Glyzerin.

Da der Biotin-Carboxylase-Test schon durch niedrige Ammoniumsulfatkonzentrationen gestört wird, ist es wichtig, ausgiebig zu dialysieren oder die Probe vorher über eine kurze Sephadex G50-Säule zu entsalzen.

Nach der Chromatographie an DEAE-Sephadex ist die Biotin-Carboxylase etwa 1000-fach angereichert. Die Präparation ist frei von Carboxyl-Transferase Aktivität und von Carboxyl Carrier Protein.

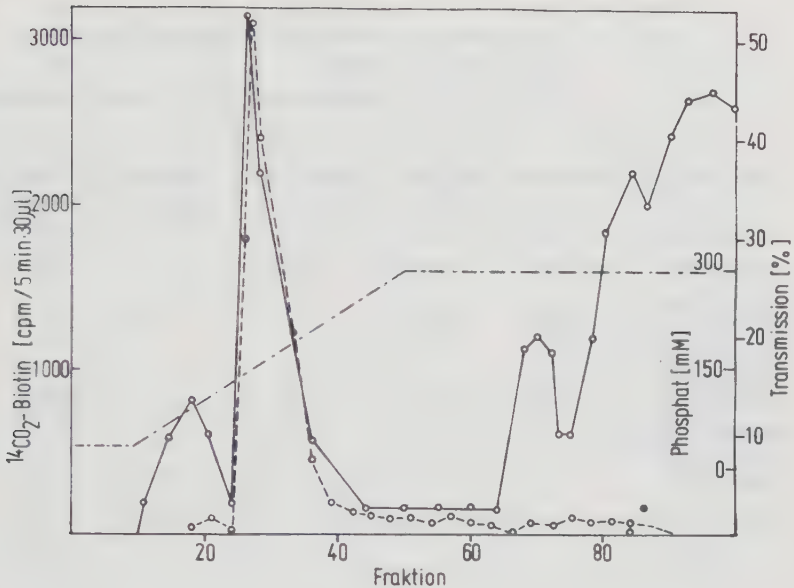


Abb. 29: Chromatographie der Biotin-Carboxylase-
Präparation nach dem Gelschritt an DEAE-Se-
phadex A25

92 mg Protein werden in 20 ml 25 mM Phosphatpuffer pH 7.0 auf eine 50 ml Säule (2 x 16 cm) gepumpt und mit einem linearen 100 ml Gradienten von 25-300 mM Phosphat mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 15 ml/h eluiert. Biotin-Carboxylase Aktivität wird in 30 µl jeder Fraktion (2.1 ml) mit dem radioaktiven BC-Test bestimmt.

(o --- o) = Radioaktivität

(o ——— o) = Protein

(- - - - -) = Phosphatgradient

In Tabelle 8 sind die Daten einer typischen Anreicherung zusammengefaßt. Auf Grund der niedrigen Anfangsaktivität im Rohextrakt (0.11 mU/mg Protein; E. coli: 3.0 mU/mg) wird darauf verzichtet, das Enzym weiter anzureichern.

Tab. 8 : Anreicherung der Biotin-Carboxylase aus
Achromobacter IVS
200 g Zellen (Feuchtgewicht) werden eingesetzt

Fraktion	Protein (mg)	Ges.Akt. (mU)	spez.Akt. (mU/mg)	Anreich. Faktor	Ausbeute (%)
Rohextrakt	24 300	2 640	0.11	—	100
Zellfreier Extrakt	4 900	1 540	0.31	2.8	58
Calciumphos- phat-Gelad- sorption	560	1 620	2.9	9.2	61
Chromatogra- phie an DEAE- Sephadex	11.8	1 230	104.3	36.0	47

Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht wird durch Gelfiltration und Sedimentation im Sucrosegradienten nach Martin und Ames (42) bestimmt. Die SDS-Gelelektrophorese ist unbrauchbar, da fast das ganze Gel anfärbt. Verwendet man die maximale spezifische Aktivität der Biotin-Carboxylase aus *E. coli* (3-6 U/mg) (10) für die Berechnung der Reinheit der angereicherten Biotin-Carboxylase, dann ergibt sich ein Reinheitsgrad von etwa 2-3 %.

Gelfiltrationsexperimente an Sephadex 200 ergeben ein Molekulargewicht von etwa 100 000. (Abb. 30). In Sedimentationsläufen wird eine Svedbergkonstante von etwa 5.3 S bestimmt. Dieser Wert entspricht auch etwa 100 000 Dalton (Abb. 31).

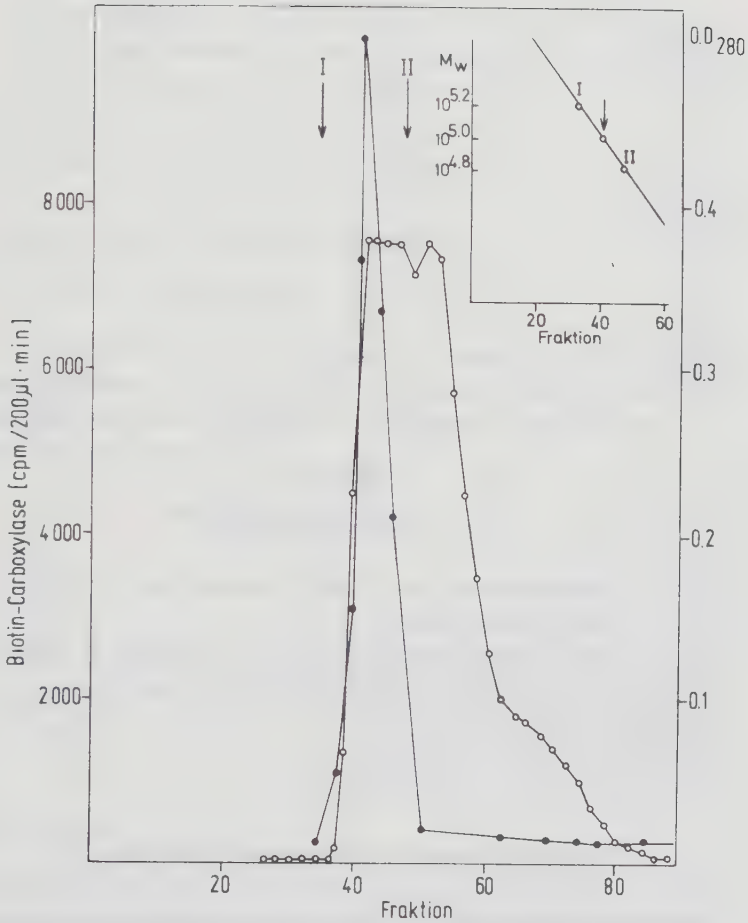


Abb.30: Gelfiltration der Biotin-Carboxylase an Sephadex G 200

550 mU Biotin-Carboxylase werden über eine Sephadex G 200 Säule (1 x 92 cm) mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7.5, 0.5 M NaCl, 20 % Glycerin, filtriert. In den 2.2 ml Fraktionen wird die Biotin-Carboxylase radioaktiv bestimmt. Als Eichproteine werden Aldolase aus Kaninchenmuskel (I) und Rinderserumalbumin (II) verwendet.

(●—●) = Biotin-Carboxylase
(○—○) = Protein

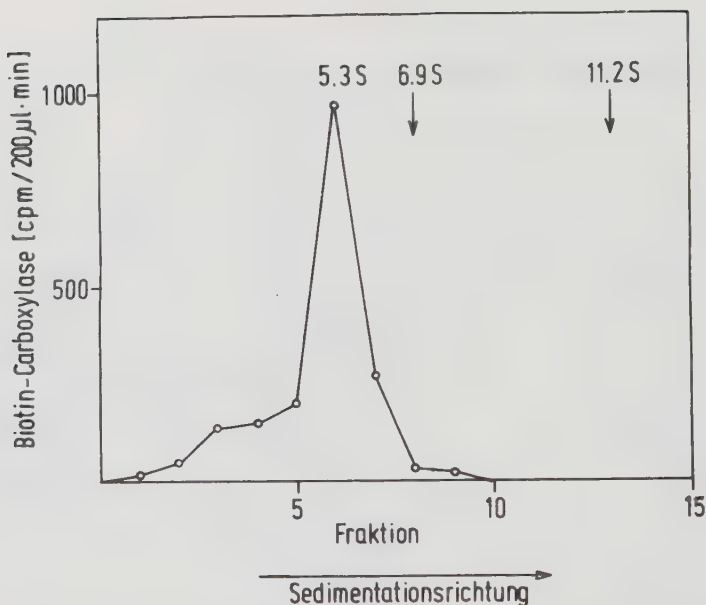
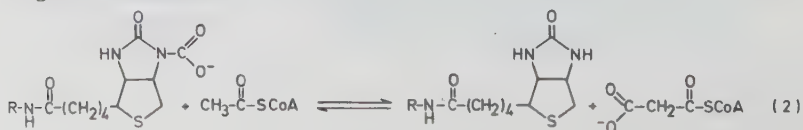


Abb.31 :Sedimentation der Biotin-Carboxylase im 5-20 %
Sucrosegradienten.

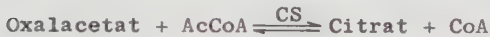
60 mU Biotin-Carboxylase werden 31 im SW 40 Ti Rotor
bei 39 000 rpm und 5°C zentrifugiert
Die Eichproteine sind Lactatdehydrogenase (6.9S) und
Katalase (11.2S).

D. Carboxyl-Transferase aus Achromobacter IVS

Carboxyl-Transferase (CT) ist ein Sammelbegriff für alle
Teilenzyme, die die "aktivierte" Carboxylgruppe von
enzymgebundenem oder freiem d-Biotin (und dessen Analoga
wie d-Biotinmethylester und d-Biotinyl (8)) auf ein
Akzeptormolekül übertragen. Die Carboxyl-Transferase
ist verantwortlich für die Spezifität des Biotin-Enzyms.
Im Falle der Acetyl-CoA-Carboxylase katalysiert sie
folgende Reaktion:



Die enzymatische Aktivität der Carboxyl-Transferase wird optisch bestimmt, indem die Bildung des in der Rückreaktion entstehenden Acetyl-CoA über die Malatdehydrogenase- und Citratsynthasereaktionen nach Decker (49) gemessen wird.:



Diese Bestimmungsmethode kann auf Grund der relativ hohen Ausgangsaktivität der Carboxyl-Transferase auch bei Rohextrakten verwendet werden und liefert reproduzierbare Ergebnisse (Abb. 32).

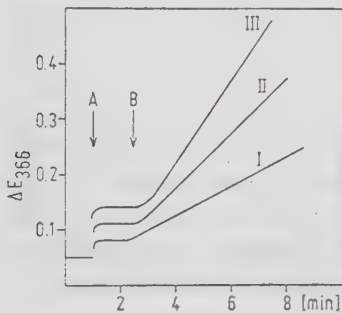


Abb. 32: Zeit- und Enzymabhängigkeit der optischen Bestimmung der Carboxyl-Transferase.

Die Küvette enthielt die Substrate und Hilfsenzyme des optischen CT-Testes (s. Experimentalteil).

Zum Zeitpunkt (A) wurden (I) 29 µg, (II) 57 µg und (III) 115 µg Protein der Ca-P-Gelfraktion eingesetzt. Gestartet wurde bei (B) mit d-Biotinmethylester.

Anreicherung

Die ersten Schritte zur Anreicherung der Carboxyl-Transferase sind identisch mit denjenigen der Biotin-Carboxylase-Anreicherung aus *Achromobacter* (siehe II.c).

Während jedoch die Biotincarboxylase bei 180 mM Phosphat vom Calciumphosphatgel desorbiert, muß die Carboxyl-Transferase mit 260 mM Phosphatpuffer pH 7 eluiert werden. Die Calciumphosphatgel-Fraktionierung ist deshalb sehr effektiv. Die Präparation ist danach frei von Biotin-Carboxylase und Carboxyl Carrier Protein.

Tab. 9 zeigt die Daten einer typischen Anreicherung.

Tab. 9 :Anreicherung der Carboxyl-Transferase aus
Achromobacter IVS
40 g Zellen (Feuchtgewicht) werden eingesetzt

Fraktion	Protein (mg)	Ges.Akt. (U)	Spez.Akt. (U/mg)	Anreich. Faktor	Ausbeute (%)
trüber Rohextrakt	4 860	37.8	0.0078	-	100
Zellfreier Extrakt	2 940	13.5	0.0046	0.59	36
55% Ammonium- sulfatfällung	1 170	14.8	0.0126	2.74	39
Calciumphos- phat-Gelad- sorption	44	9.4	0.2783	22.09	25

Substratspezifität

Die Carboxyl-Transferase-Komponente der Acetyl-CoA-Carboxylase- aus Achromobacter zeigt eine ähnlich hohe Spezifität für Acetyl-CoA wie das E.coli Enzym (19). Auch bei hohen Konzentrationen an eingesetztem Propionyl-CoA oder Pyruvat wird keine meßbare Radioaktivität in Methylmalonyl-CoA oder Oxalacetat eingebaut (Tab.10).

Tab. 10: Substratspezifität der Carboxyl-Transferase aus
Achromobacter IVS

20 mU CT_A, 40 mU BC_A und 50 pmol CCP_A werden im radioaktiven Acetyl-CoA-Carboxylase-Test mit verschiedenen Substraten 5 Min. bei 30° C inkubiert. Nicht fixiertes H¹⁴CO₃⁻ wird mit CO₂ verblasen.

Substrat	Fixiertes H ¹⁴ CO ₃ ⁻ (µmol/min)
0 mM Acetyl-CoA	0
0.5 mM Acetyl-CoA	10.2
1.5 mM Acetyl-CoA	9.9
1.5 mM Propionyl-CoA	0
1.5 mM Pyruvat	0

Die Carboxyl-Transferase Aktivität läßt sich durch enzymatische Carboxylierung des Carboxyl Carrier Proteins demonstrieren. $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA wird mit Carboxyl-Transferase und Carboxyl Carrier Protein inkubiert. Bei der anschließenden Gelfiltration wird ein Teil der Radioaktivität als carboxylierter Carrier eluiert. Dieser Anteil an Radioaktivität ist säurelabil (Abb. 33).

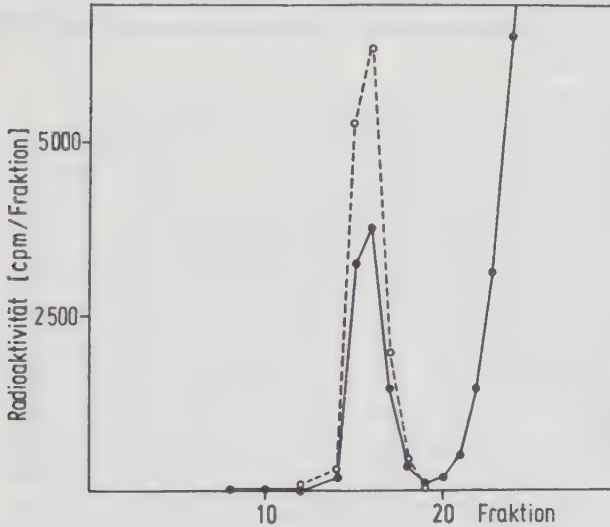


Abb.33: Carboxylierung des Carboxyl Carrier Protein durch Carboxyl Transferase aus *Achromobacter* IVS

500 pmol CCP₁₁₀₀₀ (= 8800 cpm im Biotin) werden mit 4 mU₁₄-Carboxyl-Transferase in Gegenwart von 5 nmol $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA in 50 mM Imidazol-HCl pH 7.0 15 min. inkubiert. Der Inkubationsansatz wird auf eine 1 x 20 cm AcA 54 Säule aufgetragen und mit 50 mM Tris HCl pH 8.5 bei 4° C eluiert. 0.2 ml Aliquote der 0.4 ml Fraktionen werden angesäuert und getrocknet. Zur anderen Hälfte der Fraktion wird 50 µl 2 N NaOH zugegeben und danach erst getrocknet und die Radioaktivität ausgezählt.

●-----● säurestabile Radioaktivität
○-----○ säurelabile " "

E. Rekonstitution der Acetyl-CoA-Carboxylase aus
den angereicherten Teilenzymen

Mit der angereicherten Biotin-Carboxylase, der Carboxyl-Transferase und dem Carboxyl Carrier Protein aus Achromobacter kann nun die Gesamtreaktion der Acetyl-CoA-Carboxylase katalysiert werden. In Abb.34 wird ein solches Experiment beschrieben.

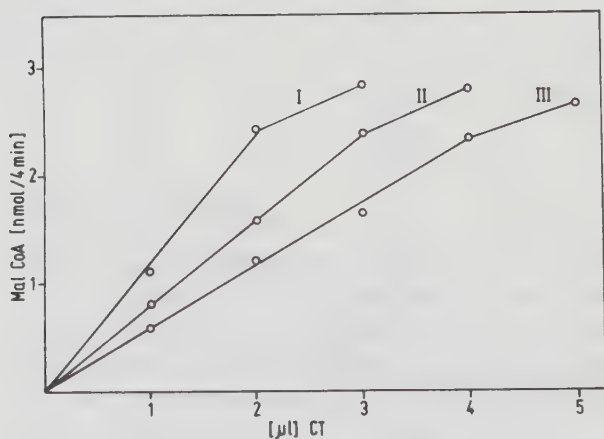


Abb.34 : Rekonstitution der Acetyl-CoA-Carboxylase aus den
Teilenzymen

20 mU Biotin-Carboxylase werden mit steigenden Mengen an Carboxyl-Transferase (3.83 mU/μl) im radioaktiven Acetyl-CoA-Carboxylase-Test inkubiert. Da die Aktivität auch eine Funktion der CCP-Menge ist, werden 200 pmol (I), 100 pmol (II) und 50 pmol (III) CCP_{11 000} eingesetzt.

III. DISKUSSION

Am Anfang der Untersuchungen über die Acetyl-CoA-Carboxylase aus Achromobacter stand die Entdeckung Schieles (14), daß neben der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase noch ein weiteres Biotinylprotein vom Molekulargewicht 11 000 in Rohextrakten aus Achromobacter vorhanden ist. In Analogie zur Acetyl-CoA-Carboxylase aus E. coli postulierte er, daß dieses Protein Teil des Acetyl-CoA-Carboxylase-Systems sei.

Er stützte seine Annahme auf zwei Befunde: Erstens existiert in Achromobacter ein sehr aktiver Glyoxylat-Zyklus (43). Deshalb hätte eine Pyruvatcarboxylase keine wichtige Funktion zu erfüllen. Zum zweiten zeigte er, daß die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase und die mit diesem Enzym verbundene ^{14}C -Biotin-Radioaktivität nach Umimpfen der Bakterien von Isovaleriansäure als Kohlenstoffquelle auf Essigsäure langsam verschwindet. Die an das 11 000 Dalton Polypeptid gebundene Radioaktivität bleibt aber unverändert erhalten. Für die Acetyl-CoA-Carboxylase muß man ein solches Verhalten auch fordern, denn dieses Enzym ist verantwortlich für den ersten Schritt der de novo Biosynthese von Fettsäuren und somit lebenswichtig für die Zelle.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen bestätigen Schieles Hypothese. In Rohextrakten aus Achromobacter IVS findet eine ATP- und Hydrogencarbonat-abhängige Carboxylierung von Acetyl-CoA statt. Die irreversible Hemmung dieser Reaktion durch Avidin beweist, daß Biotin als Coenzym beteiligt ist. Die für die Carboxylierung verantwortlichen Teilenzyme können voneinander getrennt und einzeln angereichert werden. Die Struktur ist also analog zur Acetyl-CoA-Carboxylase aus E. coli, die aus Biotin-Carboxylase, Carboxyl-Transferase und Carboxyl Carrier Protein besteht.

Bei physiologischen Salzkonzentrationen kann eine Membranfraktion durch Sucrosegradientenzentrifugation isoliert werden, die 60 % der gesamten Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität enthält. Obwohl bisher noch keine membrangebundenen Biotinenzyme isoliert worden sind (1), gibt es mehrer Hinweise auf hohe Affinität zumindest von Teilenzymen zur Membran.

Aus der Aminosäureanalyse der Carboxyl Carrier Proteine aus Achromobacter wie aus E.coli errechnet sich ein Anteil an unpolaren Aminosäuren von 52 %. Kannangara und Jensen (44) isolierten aus den Lamellen von Gerste-Chloroplasten ein 21 000 Dalton Carboxyl Carrier Protein. Aus den Untersuchungen von Stumpf und seinen Mitarbeitern (11) geht hervor, daß die Bindung der Biotinylproteine an die Membran vermutlich ein allgemeingültiges Prinzip bei Chloroplasten ist. Der Vorteil für die prokaryoten, dissoziierbaren Enzyme ist offensichtlich. Die geordnete Bindung der Teilenzyme an eine Matrix bestimmt die Stöchiometrie und ermöglicht vermutlich die Regulation des Enzyms durch Veränderung der Umgebung.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß Heger et al. (45) bei der Isolierung der Acetyl-CoA-Carboxylase aus Rattenleber besonders Phosphatidylinositol mit anreicherten. Sie wiesen nach, daß etwa 130 Moleküle dieses Phospholipids pro Molekül Enzym für die volle Aktivität der Acetyl-CoA-Carboxylase notwendig sind. Obwohl das Monomer dieses löslichen Enzyms nach neuesten Untersuchungen von Tanabe et al. (46) aus einer Kette besteht, auf der sich alle Teilaktivitäten des Enzyms befinden, und das Enzym deshalb auch keine ordnende Matrix braucht, ist die Aktivität lipidabhängig.

Hinweise dafür, daß auch die Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase eine starke Affinität zur Membran besitzt, liefern Experimente von Sumper und Träuble (77) und Sumper (78). Sie

zeigten, daß die Produkte der Fettsäuresynthese, Palmityl-CoA und Stearyl-CoA von der Fettsäuresynthetase auf die Acetyl-CoA-Carboxylase als Acceptor übertragen werden. Weiterhin wies Sumper (78) nach, daß letzteres Enzym durch Palmityl-CoA stark gehemmt wird.

Auf Grund seiner Ergebnisse schlägt Sumper (78) ein Modell vor, in dem die Acetyl-CoA-Carboxylase als Überträger der langkettigen Acyl-CoA-Verbindungen zwischen dem Ort ihrer Synthese und der Membran wirkt. Die laterale Diffusion in der Ebene der Membran wäre dann der Mechanismus für den weiteren Transport zu den nachfolgenden Enzymen der Lipidsynthese, die fest an die Membran gebunden sind (79).

Die oben angeführten Untersuchungen lassen es als sinnvoll erscheinen, daß die Acetyl-CoA-Carboxylase und vermutlich auch die anderen Enzyme der Lipidsynthese an die Membran gebunden sind. Da Bakterien im Wesentlichen nur die zytoplasmatische Membran besitzen, würden sich aufwendige Transportmechanismen erübrigen.

Die Ähnlichkeit der Acetyl-CoA-Carboxylasen aus Achromobacter und aus E.coli ist auffallend. Die Teilenzyme beider Systeme sind dissozierbar; das Molekulargewicht beider Biotin-Carboxylasen liegt um 100 000, das der Carrierproteine um 22 000. Deshalb ist es auch nicht verwunderlich, daß Antiserum, hergestellt gegen den Achromobacter Carrier mit dem Biotinylprotein aus E.coli kreuzreagiert. Da die Aminosäurezusammensetzung der beiden Carrier Proteine sehr ähnlich ist, wird aus diesem und dem immunologischen Befund geschlossen, daß zwischen der Primärsequenz der beiden Proteine weitgehende Homologie besteht.

Das gleiche Anti-CCP_A-Serum ist aber gegen die biotin-haltige Untereinheit der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase aus Achromobacter inaktiv. Die beiden Biotinenzyme aus Achromobacter weisen also nicht nur strukturelle Unterschiede auf, sondern unterscheiden sich auch hinsichtlich der antigenen Determinanten in der Umgebung des Biotins.

Überblickt man die Familie der Biotinenzyme, so erkennt man vier verschiedene strukturelle Typen. (Abb.30):

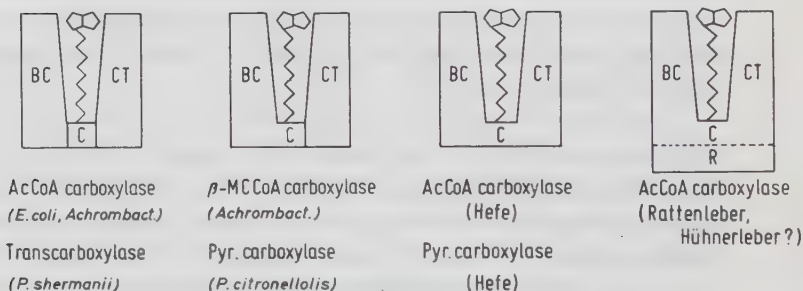


Abb.30: Hypothetische Modelle von Biotinenzymen

BC = Biotin-Carboxylase
 CT = Carboxyl-Transferase
 C = Carboxyl Carrier Protein
 R = Regulatorische Untereinheit

Entwicklungsgeschichtlich repräsentieren die Acetyl-CoA-Carboxylasen aus Bakterien mit ihren unfunktionellen Polypeptidketten vermutlich die früheste Stufe der Biotinenzyme. die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase mit einer bi- und einer unfunktionellen Kette ist demnach zwischen den eukaryoten Biotinenzymen, die, wie Spieß (36) im Fall der Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase zeigen konnte, aus polyfunktionellen Proteinen besteht, und den bakteriellen Enzymen einzureihen. Die Acetyl-CoA-Carboxylasen aus Geweben mit ihren integrierten regulatorischen Untereinheiten stehen auf der höchsten Entwicklungsstufe.

Die Hierarchie der Biotinenzyme ist vermutlich das Ergebnis von sukzessiven Rasterschubmutationen, die, wie Yourno et al.(12) zeigen konnten, zu Genfusionen führen können. Es gelang ihnen, die *hisD* und *hisC* Gene des Histidin-Operons von Salmonella typhimurium zu fusionieren und dadurch ein bifunktionelles Enzym herzustellen, das sowohl den zweiten, wie auch den dritten Schritt der Histidin-Biosynthese katalysiert.

Der Entwicklung des Zellinneren zu komplexeren Strukturen scheint also auch eine höhere strukturelle Organisation der Enzyme zu folgen. Daß dies aber kein allgemeingültiges Prinzip ist, zeigen Untersuchungen des dritten und vierten Schrittes der Tryptophan-Biosynthese. In der Hefe werden die dafür verantwortlichen Enzyme von getrennten Genen codiert (71), während beide Syntheseschritte in E.coli von einem einzigen Enzym (mit einem Gen) ausgeführt werden (72,73).

Die Untersuchungen in dieser Arbeit bestätigen allerdings die in der Einführung erläuterte Auffassung, daß sich Systeme aus einzelnen, trennbaren Enzymen im Rahmen der Evolution zu hochgeordneten Multienzymkomplexen mit multifunktionellen Polypeptidketten entwickelt haben. Daß dabei mehrere Entwicklungsstufen gleichzeitig in einem Organismus auftreten können, wurde durch Untersuchungen an Achromobacter IVS gezeigt.

IV. EXPERIMENTELLES

A. Verwendete Geräte

Beckman L2-65B Ultrazentrifuge

Beckman L3-50 Ultrazentrifuge

Sorvall RC2-B Zentrifuge

Stock-Zentrifuge

Durchlaufzentrifuge von Padberg

Wkf-Zentrifuge (G50K)

Tischzentrifuge, Christ Superspeed Junior

Hettich Mikroliter-Zentrifuge

Fraktionskollektor und Säulenchromatographie-Zubehör
von Serva

Schlauchpumpe (Varioperpex) LKB, Stockholm

Aminosäureanalysator von Biotronik, München,

mit Philipps-Schreiber PM 8221 und Integrator
(System I) von Biotronik

Flüssigkeitsszintillationszähler Mark II von Nuclear
Chicago Division

Flüssigkeitsszintillationszähler Packard Tri-carb Modell
314 und 544

Radiopapierchromatograph und Radiodünnschichtscanner
von Friesseke und Hoepfner

Gleichspannungs-Speisegerät von Camag, Buchler und LKB

Isoelektrische Fokussierungssäule, 110 ml und Multiphor
mit Zusatz für präparative Fokussierung von
LKB, Stockholm

Lyophilisator (WKF LO5)

pH-Meter, Modell E 500 von Metrohm

Zellhomogenisator nach Merckenschlager

Photometer mit Kompensationsschreiber 6511 von Eppendorf

Zeiss-Spektralphotometer PM QII und PM6

Fluorimeter

Michl-Elektrophorese-Apparatur und kleines und großes

Zellaufschlußgerät nach Merckenschlager, Schlossmann und
Kurz, Eigenbau, Moosbauer

Membranfiltrationsgeräte und -Filter von Amicon N.V.
Bakterienfilter von Sartorius Membranfilter

B. Hilfsenzyme und Chemikalien

Fettsäuresynthetase aus Bierhefe wurde freundlicher-
weise von Herrn S. Hess, Max-Planck-Institut für Biochemie,
Martinsried, zur Verfügung gestellt.

Biotin-Carboxylase und Carboxyl-Transferase aus E.coli
wurden nach Guchhait et al. angereichert (siehe Kap. IV.,K).

Alle übrigen Enzyme wurden von der Firma Boehringer,
Mannheim bezogen.

Andere Substanzen:

Cytochrom c, ATP, Phosphoenolpyruvat, NADH, CoA von
Boehringer, Mannheim

Serumalbumin vom Rind und Agarose von den Behringwerken,
Marburg

Avidin, Trypsin, Pepsin, 1-(1-Tosylamido-2phenyl)äthyl-
chloromethyl-ke-ton, Acrylamid, N.N'-Methylen-
bisacrylamid, Dowex 50x2, 50x8, 1x2, 2x8,
Phosphozellulose, Natriumdodecylsulfat, Dithio-
threit ,Coomassie Brilliantblau G von Serva,
Heidelberg

DEAE-Zellulose von Whatman

Sephadex G 25, G 75, G 200 von Pharmacia, Uppsala

Bacto-Agar, Bacto-Pepton von Difco, Detroit

Komplettes, Freund'sches Adjuvants von Difco, Detroit

Ampholine und PAG-Platten von LKB-Produkter AB, Stockholm

Isovaleriansäure, Guanidinhydrochlorid, N.N.N'.N'-Tetra-
methyläthylendiamin, Kaliumborhydrid von Schuchardt, München

Aluminiumoxyd von Alcoa, Arkansas

Varsol von Esso, München

2.5-Diphenyloxazol (PPO) und 1.4-Bis-2(5-phenyloxazol)-
benzol (POPOP von Interchem, München

Methansulfonsäure und Tryptamin von Fluka

Empigen BB von Marchon, Whitehaven, England

^{14}C - NaHCO_3 und ^{14}C -Biotin von The Radiochemical Centre,
Amersham

Alle nicht eigens angeführten Chemikalien stammten von der Firma Merck, Darmstadt. Außer für die Züchtungsmedien wurde die höchste Reinheitsstufe verwendet.

C. Züchtung von Achromobacter IVS

Die Versuche wurden mit Achromobacter IVS durchgeführt, einem Stamm der auf Isovaleriansäure oder Acetat als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann.

Zur Aufbewahrung wurde ein Teil in gefriergetrockneter Form bei -16° gehalten. Ein anderer Teil wurde etwa alle 3 Monate auf Fleischextrakt-Agar (47) neu überimpft und bei 30°C gehalten, bis sich eine Bakterienschicht gebildet hatte. Diese Bakterien wurden dann bei 4°C aufbewahrt (14).

Der Fleischextraktagar hat die folgende Zusammensetzung (47):
Im einem Liter befinden sich 10 gr Fleischextrakt, 10 gr Pepton, 9 g NaCl 6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

Die Lösung wird mit KOH auf pH 7.4 eingestellt, dann werden 20 g Agar (Difco) zugegeben.

Das Acetat-Minimalmedium (14) wird in konzentrierter Form bei Raumtemperatur aufbewahrt und für die Züchtung jeweils verdünnt.

In 10 Liter werden gelöst: 1000 g NaCl, 1200 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 360 g KH_2PO_4 , 20 g $\text{MgSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 1.5 g EDTA (freie Säure), 0.2 g $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Dazu werden 10 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, gelöst in wenig H_2O , gegeben.

Die konzentrierte Salzlösung wird mit 1 Ltr. Essigsäure versetzt und unter Rühren mit konzentrierter Kalilauge auf pH 7.4 gebracht. Es fällt dabei ein Niederschlag aus. Zur Züchtung wird das aufgewirbelte Medium so weit verdünnt, daß 1 Ltr. 5 ml Essigsäure enthält. Für den Essigsäure-Agar wird das Medium auf 2.5 ml Essigsäure pro Liter verdünnt. Dazu werden 2 % Agar gegeben.

Das Isovaleriansäure-Medium wurde analog hergestellt. Statt Eisessig wurde das gleiche Volumen Isovaleriansäure eingesetzt.

Das Züchtungsverfahren ist weitgehend von Schiele (14) ausgearbeitet worden. Die frisch gewachsene Bakterien-schicht von 2 Fleischextrakt-Schrägagarröhrchen, die sich nach etwa 3-4 Tagen gebildet hatte, wurde in 100 ml Acetat-medium übertragen. Die Züchtung erfolgte in einem Erlenmeyerkolben von 250 oder 300 ml, der mit einem Wattepfropfen verschlossen war und bei 30° C mit 100 Umdrehungen pro Minute geschüttelt wurde.

Nach 1 bis 2 Tagen erreichte die Kultur im allgemeinen eine Bakteriendichte (Extinktion = 1, bei 578 nm, Eppendorf Photometer Serie 11, Blende 7 x 12 mm, d = 1), daß sie in ein 0.8-Ltr-Medium übertragen werden konnte. Die Kultur wurde unter den gleichen Bedingungen in einem 1 l Fernbachkolben geschüttelt.

Nach weiteren 1 bis 2 Tagen waren die Bakterien wiederum so weit gewachsen, daß sie auf eine 6-Ltr-Belüftungskultur übertragen werden konnten. Das Medium befand sich in einer 10-Ltr.Glasflasche. Die durch ein mit Watte gefülltes CaCl₂-Rohr gefilterte Luft wurde durch ein sterilisiertes Glasrohr eingeleitet. Die Belüftung wurde stufenweise mit dem Bakterienwachstum erhöht (Abb. 31). Nach etwa einem Tag wurde die Kultur auf fünf 20-Ltr-Medien in 25 Ltr.-Polyäthylenflaschen verteilt. Bis zu dieser Stufe waren die Bakterien unter sterilen Bedingungen gezüchtet worden. Bei den folgenden Stufen wurde darauf verzichtet.

Die Bakterien wurden wiederum bei stufenweise gesteigerter Belüftung gezüchtet. Die durch eine Watteschicht von etwa 10 cm filtrierte Luft wurde durch ein Glasrohr eingeleitet, an dessen Ende ein Bimsstein von 2.5 x 2.5 x 5 cm angebracht war. Nach 20 bis 30 Stunden hatte die Extinktion einen Wert von 1.5 bis 2.2 erreicht.

Zwei 20 l Kulturen dienten nun zum Animpfen einer 240 l Kultur in einem vollautomatischen Fermenter. Nach etwa 2 h schwacher Belüftung wurde sie auf $9 \text{ m}^3/\text{h}$ gesteigert. Es erwies sich als günstig, die Temperatur von 30 auf 37°C heraufzusetzen. Der pH wurde durch Zugabe von Essigsäure auf 7.4 gehalten. Nach weiteren 6-8 h wurde die Züchtung im ersten Drittel der logarithmischen Wachstumsphase abgebrochen und die Zellen nach raschem Abkühlen auf 2°C in einer Padberg Durchlaufzentrifuge bei 18 000 Umdrehungen pro Minute mit einer Pumpgeschwindigkeit von etwa 3,5 l/min. abzentrifugiert. Die Ausbeuten lagen zwischen 600 und 800 Gramm.

Zur radioaktiven Markierung der Biotinylproteine wurde den 100 ml Kulturen 10 μCi Carbonyl- ^{14}C -Biotin zugesetzt. Geerntet wurden dann die 20 l Kulturen.

In einigen Fällen wurde auf die ersten Züchtungsstufen verzichtet. Abzentrifugierte und bei 4°C aufbewahrte Bakterien wurden direkt im Medium suspendiert, so daß sich eine Dichte von $\text{OD}_{578} = 0.5$ ergab. Nach anfänglicher schwacher Belüftung konnte normal weiter gezüchtet werden. Geringere Wachstumsgeschwindigkeiten oder lange lag-Phasen wurden nicht beobachtet.

Außer wenn mit ^{14}C -Biotin gearbeitet wurde, enthielt das Medium 0.1 mg/l an kaltem D-(+)-Biotin. Durch diesen Zusatz verringerte sich die Generationszeit von 210 auf 180 min. (Abb. 31).

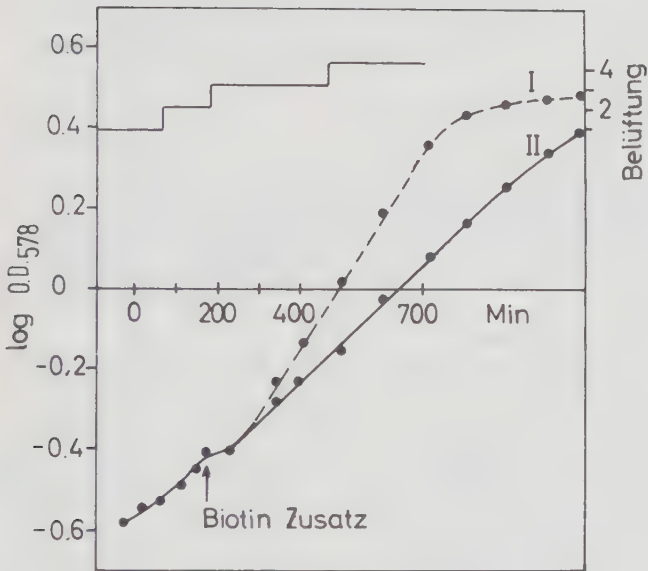


Abb. 36 : Wachstum mit und ohne Zusatz von Biotin

Eine zwei Liter Belüftungskultur wurde drei Stunden nach Animpfen (Pfeil) geteilt. Der Kultur I wurde 0.1 mg D-(+)-Biotin zugegeben. Beide Kulturen wurden normal weiter belüftet.

D. Züchtung von E.coli B

Escherichia coli B wurden auf Fleischextrakt-agar plattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert. Danach wurde eine 10 l Belüftungskultur angeimpft, die wiederum nach ca. 12 Stunden Wachstum als Inokulum für eine 200 l Kultur diente. In einem Fermenter der Firma Bioengineering, Uster, Schweiz, wurden die Bakterien etwa 3 bis 4 Stunden bei 37° C belüftet. In dieser Zeit vermehrten sie sich von etwa 1×10^8 bis 3.8×10^9 . Geerntet wurden sie noch in der logarithmischen Phase, indem sie innerhalb von 10 min. auf

4° C abgekühlt wurden. Mit einer Pumpgeschwindigkeit von 3.5 l/min wurden sie in einer Padberg Durchlaufzentrifuge Typ 619 bei 17 000 rpm abzentrifugiert und sofort danach eingefroren.

Medium

Für das Medium wurde ein in der Abteilung Zillig, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, entwickeltes Rezept verwendet, das auf Fraser et al. (48) zurückgeht.

Es enthielt (pro Liter):

10 g Pepton, 15 g Hefeextrakt, 0.7 g NaOH, 5 g Glucose, 50 ml Fraser-Medium und 50 ml Phosphatmix.

Frasermedium (pro Liter):

0.2 g Gelatine, 0.66 g CaCl_2 , 20 g NH_4Cl , 6 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und 0.5 l Glycerin.

Phosphatmix (pro Liter):

216 g K_2HPO_4 und 16 g KH_2PO_4 .

Die Glucoselösung, das Frasermedium und der Phosphatmix wurden getrennt sterilisiert.

E. Bestimmung der Enzymaktivitäten

1. Der radioaktive Acetyl-CoA-Carboxylase Test erfolgte durch Einbau von $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ in Malonyl-CoA in Anlehnung an Albers et al. (19).

Der Testansatz enthielt in 100 μl :

Imidazol-HCl pH 8.0 100 mM; MgCl_2 8 mM; Dithiothreitol 2 mM; Acetyl-CoA 1.2 mM; ATP 5 mM; $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ 20 mM (0.2 bis 5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{M}$); und Serumalbumin 40 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$. Gestartet wurde die Reaktion durch Zusatz von 0.1 bis 5 mU Acetyl-CoA-Carboxylase. Nach 5 Minuten Inkubation bei 30° C wurde die Reaktion durch Zusatz von 20 μl 6 N HCl abgestoppt. Das gefällte Protein wurde 4 Minuten bei 10 000 g abzentrifugiert. 100 μl des Überstandes wurden auf ein

3 x 7 cm Filterpapierblättchen (Whatman I) pipettiert und durch Föhnen getrocknet. Radioaktivität wurde in Toluol-Scintillator (0.5 g POPOP und 5 g PPO pro Liter Toluol) ausgezählt.

Blindwerte wurden mit dem gleichen Inkubationsansatz, jedoch ohne Acetyl-CoA, bestimmt. Da frische Rohextrakte noch endogenes Acetyl-CoA enthielten, wurde zur genauen Bestimmung der Aktivität eine Zeitkurve aufgenommen und die Verschiebung der Blindwertkurve rechnerisch kompensiert (siehe Abb. 37).

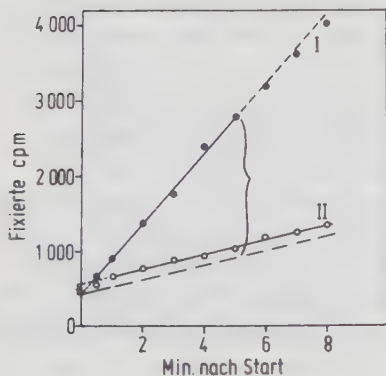


Abb. 37.

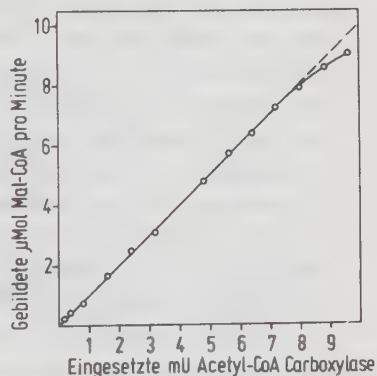


Abb. 38

Abb. 37 : Zeitabhängigkeit der Acetyl-CoA-Carboxylase
Reaktion

Die Inkubationen wurden mit (Kurve I) und ohne (Kurve II) Acetyl-CoA nach verschiedenen Zeiten abgestoppt (siehe Kap. V, E 2). Die Kurven wurden bis zur 0-Zeit extrapoliert und die Blindwertkurve um den Differenzbetrag verschoben. Eingesetzt wurden 0.2 mU Acetyl-CoA-Carboxylase. Die spezifische Radioaktivität von $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ war 0.8 mCi/mmol.

Abb. 38: Enzymabhängigkeit der Acetyl-CoA-Carboxylase
Reaktion

0.2 bis 9.8 mU Acetyl-CoA-Carboxylase wurden wie unter Kap. V, E 3 beschrieben getestet.

2. Acetyl-CoA-Carboxylase Aktivität wurde optisch nach Matsushashi et al. (16) mit Hilfe von Fettsäure synthetase oder Pyruvatcarboxylase und Lactatdehydrogenase bestimmt.

3. Der radioaktive Biotin-Carboxylase Test entsprach der Vorschrift von Guchhait et al. (8). Die Carboxylierung von freiem D-Biotin wird nachgewiesen durch Einbau von $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ in ein Produkt (1'-N-(^{14}C)-Carboxybiotin), das bei Verdünnen des nicht fixierten $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ mit CO_2 (g) stabil bleibt.

Der Testansatz enthält:

100 mM Triäthanolamin-HCl, pH 8.0; 1 mM ATP; 8 mM MgCl_2 ; 8 mM NaHCO_3 (500 cpm/nmol); 50 mM d -Biotin; 3 mM Glutathion; 0.3 mg Rinderserumalbumin; 50 μl Äthanol; und 0.1 bis 1.0 mU Biotin-Carboxylase in einem Gesamtvolumen von 0.5 ml. Die Reaktion wird durch Zusatz der Enzympräparation gestartet, 10 Minuten bei 30°C inkubiert und durch rasches Verdünnen mit eiskaltem Wasser gestoppt.

Die Reaktion ist nullter Ordnung und ihre Geschwindigkeit ist proportional zur Enzymkonzentration. Nach Zusatz von 3 Tropfen N-Oktanol wird bei 0 bis 2°C 30 min. CO_2 durch die Lösung geblasen. Danach werden 0.1 ml 0.1 N NaOH zugegeben und der ganze Ansatz in Unisolve ausgezählt. Unter diesen Bedingungen wurden etwa 10 bis 15 % Verlust von Carboxybiotin gemessen ($T_{1/2} = 190$ min. für die Decarboxylierung, Abb. 39). Der Test war linear für Aktivitäten von 0.1 bis 2.0 mU.

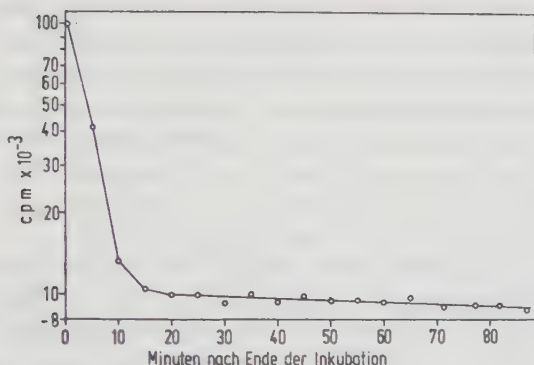
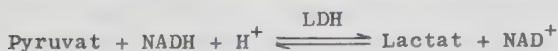
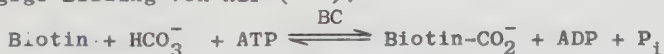


Abb.39: Halbwertszeit der Decarboxylierung von Carboxybiotin

Einem zweifachen Testansatz zur Bestimmung des Biotin-carboxylaseaktivität (siehe Kap. V,E 3) wurden nach Ende des Inkubation unter Einleiten von CO₂ in regelmäßigen Zeitabständen Aliquote entnommen; nach Zugabe von KOH wurde die noch vorhandene Radioaktivität bestimmt. Aus der Kurve errechnet sich eine Halbwertszeit von $T_{1/2} = 190$ min.

4. Optisch wurde die Biotin-Carboxylase Aktivität bestimmt durch Koppelung der NADH Oxydation an die d-Biotin abhängige Bildung von ADP (8).



In einem 1.0 ml Ansatz befanden sich die gleichen Substrate in den gleichen Konzentrationen wie für den radioaktiven Test, nur wurde $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ gegen unmarkiertes Bikonbonat ausgetauscht. Zusätzlich befanden sich in der Küvette: 0.5 mM Phosphoenolpyruvat, 0.2 mM NADH, 5 U Lactatdehydrogenase, 3 U Pyruvatkinase und 2 bis 10 mU Biotincarboxylase. Die Reaktion wurde durch Zusatz von Biotin gestartet und die Abnahme von NADH bei 334 nm und 25° C gemessen.

Sowohl die radioaktive wie auch die optische Bestimmungsmethode der Biotin-Carboxylase-Aktivität erwiesen sich als außerordentlich empfindlich gegenüber schon niedrigen Konzentrationen an Ammoniumsulfat. Deshalb wurden die zu testenden Fraktionen entweder ausgiebig dialysiert oder kurz vor der Bestimmung über kleine Sephadex G25 Säulen entsalzt.

Abb. 40 zeigt die Abhängigkeit der Biotin-Carboxylase- und der Acetyl-CoA-Carboxylase-Gesamtreaktion von der Ammoniumsulfatsättigung im Testansatz. Der Aktivitätsverlust der Biotincarboxylase ist auf die Anwesenheit von Ammoniumionen zurückzuführen, da Ammoniumchlorid die gleiche Kurve ergibt, Magnesiumsulfat in den gleichen Konzentrationen aber wirkungslos ist. Im Gegensatz zur Biotincarboxylase wird die Geschwindigkeit der Acetyl-CoA-Carboxylase Reaktion durch geringe Zusätze von Ammoniumsulfat gesteigert.

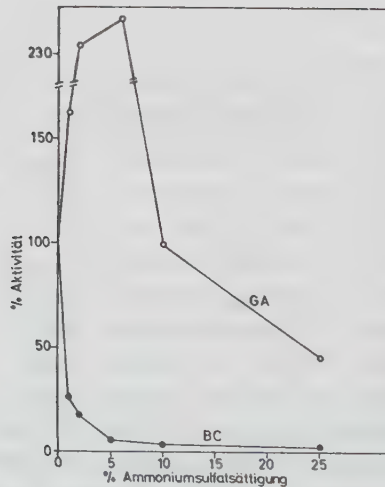
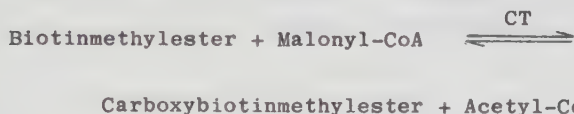


Abb.40: Abhängigkeit der Biotincarboxylase (BC) und Acetyl-CoA-Carboxylase Gesamtaktivität (GA) von der Ammoniumsulfatkonzentration im Testansatz.

5. Die radioaktive Bestimmung der Carboxyl Transferase Aktivität erfolgte durch Fixierung von radioaktivem Bikarbonat wie unter Punkt V, E 1 beschrieben. Der Reaktionsansatz enthielt jedoch zusätzlich als Hilfsenzym 10 mU Biotincarboxylase aus *E.coli*.
6. Zur optischen Bestimmung der Carboxyl Transferase wurde die Geschwindigkeit der Rückreaktion gemessen.



Das gebildete Acetyl-CoA wurde nach Decker (49) bestimmt.

Der Testansatz enthielt in einem Milliliter:

10 mM Tris-HCl pH 8.0; 0.1 mM Mal-CoA; 5 mM d-Biotinmethylester; 10 mM L-Äpfelsäure; 0.5 mM NAD⁺; 0.6 mg Rinderserumalbumin, 18 U Malatdehydrogenase, 3.5 U Citratsynthase und 1-10 mU Carboxyl Transferase. Gestartet wurde die Reaktion durch Zusatz von Biotinmethylester. Die Zunahme von NADH wurde bei 366 nm gemessen.

7. Die Konzentration von Carboxyl Carrier Protein wurde durch stöchiometrische Carboxylierung mit Hilfe von Biotin-Carboxylase bestimmt. Der Reaktionsansatz und die Durchführung entsprach dem unter Punkt V, E 3 beschriebenen Verfahren. Das Gesamtvolumen wurde jedoch auf 50 μ l herabgesetzt und die Reaktionsmischung enthielt 8 mM NaH¹⁴CO₃ (20 $\cdot$ 10³ cpm/nmol). Der Test war bis zu 200 pmol eingesetzte Biotinyläquivalente linear.
8. Der enzymatische Austausch der Carboxylgruppe zwischen Malonyl-CoA und 2-(¹⁴C)-Acetyl-CoA wurde nach Matsushita et al. (16) durchgeführt.

F. Darstellung und Bestimmung von Acetyl-CoA und Propionyl-CoA

Kaltes und 1- ^{14}C -markiertes Acetyl-CoA und Propionyl-CoA wurden nach Simon und Shemin (50) und Ochoa (51) dargestellt. Die Bestimmung von Acetyl-CoA erfolgte nach Decker (49). Die unmarkierten Substanzen wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. ^{14}C -Acetyl-CoA wurde über Dowex AGX 1 von ^{14}C -Essigsäure getrennt.

G. Darstellung von d-(+)-Biotinmethylester

D -(+)-Biotinmethylester wurde nach Knappe et al. (53) hergestellt.

200 mg d-(3)-Biotin wurde in 20 ml methanolischer HCl Lösung (2 Gew. % HCl) eine Stunde am Rückfluß gekocht. Nach raschem Abkühlen auf 0°C wurde das Methanol abgezogen, der Rückstand getrocknet und danach in kaltem Wasser verrieben. Der pH wurde mit festem Na_2CO_3 auf pH 4 eingestellt, die Fällung abgenutscht und aus Methanol/Äther umkristallisiert. Die Ausbeuten lagen um 60 %.

H. Proteinbestimmung

Protein wurde mit einer Microbiuret-Methode bestimmt, die im wesentlichen eine Abwandlung des Verfahrens nach Beisenherz (54) ist.

0.1-1.0 mg Protein in 100 μl Puffer wurden unter Zusatz von 20 μl 3 M Trichloressigsäure gefällt und 4 min. bei 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde gründlich entfernt und der Niederschlag in 500 μl Biuretreagenz aufgenommen (9 g K-Na-Tartrat, 3 g CuSO_4 , 5 g KI in 400 ml carbonatfreier 2 N NaOH-Lösung). Nach 30 min. Schütteln wurde die Probe mit 490 μl H_2O verdünnt und ihre Extinktion bei 546 nm im Eppendorf Photometer (Spalt 2.5x12 mm)

gemessen. Eine Eichkurve mit getrocknetem Serumalbumin als Standard ergab einen Korrelationsfaktor von 4.27 ± 0.03 mit H_2O in der Referenzküvette. Der Test ist linear von 0,1 bis 1,5 mg eingesetzten Proteins.

I. Herstellung der Avidin-Monomer-Sepharose

Da Biotin von Avidin praktisch irreversibel gebunden wird ($K_D = 10^{-15}(1)$) ist Avidin für die Affinitätschromatographie in seiner tetrameren Form ungeeignet. Das Avidinmonomer zeigt jedoch viel schwächere Wechselwirkungen.

Deshalb wurde von Guchhait et al. (8) eine Methode der Koppelung des Avidin-Monomers an Sepharose 4 B entwickelt. Mit einigen Veränderungen wurde diese Vorschrift übernommen:

Präparation der tetrameren Form der Avidin-Sepharose

15 g CNBr-aktivierte Sepharose 4 B wird auf einer 0.5 l G3 Fritte mit 3 l HCl gewaschen und mit 0.1 M Na-Acetat Puffer pH 5.5 äquilibriert. Die Koppelung des tetrameren Avidins wird auch bei pH 5.5 durchgeführt, um das Ausmaß der Quervernetzung so gering wie möglich zu halten. Höheres pH erhöht zwar die Ausbeute bei der Koppelung, verringert aber die Dissoziierbarkeit des tetrameren Komplexes.

Die vorbehandelte CNBr-Sepharose wird mit einem Milliliter einer 1.5 mg/ml Avidinlösung pro Milliliter sedimentierten Geles versetzt und 16 h bei $4^\circ C$ unter vorsichtigem Rühren inkubiert. Nach der Inkubation wird die Avidinlösung abgenutscht und die noch freien Imidocarboxatgruppen mit 1 M Trisbase über Nacht abgeblockt. Die tetramere Form wird mit destill. Wasser gewaschen und in 0.2 % Natriumazid bei $4^\circ C$ aufbewahrt.

Wir beobachteten etwa 20-30 % Aktivitätsverlust pro Monat bei der tetrameren Form, während die Monomer-Sepharose in wenigen Tagen ihre gesamte biotinbindende Kapazität verliert.

Dissoziation des tetrameren Komplexes zur Monomer-Sepharose

Kurz vor Verwendung wird die monomere Form der Avidin-Sepharose hergestellt indem der tetramere Komplex mit 6 M Guanidiniumchlorid dissoziiert wird und die nicht kovalent an die Matrix gebundenen Untereinheiten aus dem Gel gewaschen werden. Die gewünschte Menge an tetramerer Avidin-Sepharose wird auf einer G3-Fritte mit destilliertem Wasser gewaschen und in 5 Volumina 6 M Guanidinhydrochlorid in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0, 5 mM EDTA suspendiert. Diese Suspension läßt man 30 min. stehen, filtert den Überstand ab und wiederholt den ganzen Vorgang weitere drei Male. Nach dem vierten Waschvorgang wird das Gel mehrmals mit etwa 5 Volumina an H₂O gewaschen und schließlich in 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.0, 1 mM EDTA suspendiert.

Test der monomeren und tetrameren Avidin-Sepharose

Ein Aliquot des Gels wird mit einem Überschuß an Carbonyl-¹⁴C markiertem Biotin 30 Minuten lang unter gelegentlichem Umrühren inkubiert. Das Gel wird auf einer Millipore Membran abgefiltert, sorgfältig mit H₂O gewaschen und mit der Membran, die in Methylcellusolve aufgelöst wird, in Toluol Scintillator ausgezählt.

K. Isolierung der Komponenten der Acetyl-CoA-Carboxylase aus E.coli B

Die Reinigung der drei Komponenten des Acetyl-CoA-Carboxylase Systems aus Escherichia coli B erfolgte im wesentlichen nach einer Vorschrift, die in der Gruppe um Lane (8) ausgearbeitet worden ist. Alle Anreicherungsschritte wurden bei $2-4^{\circ}\text{C}$ ausgeführt. Die Puffer enthielten 1 mM EDTA und 5 mM 2-Mercaptoäthanol oder 5 mM Dithiothreitol.

1. Biotin-Carboxylase

Die Daten einer typischen Reinigung sind in Tab. 11 zusammengefaßt worden.

Ein Kilogramm E.coli B Zellen der logarithmischen Wachstumsphase wurden in 4 Liter 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 suspendiert und zweimal in einer "French"-Presse nach Manton-Gaulin (55) bei 600 ATÜ aufgeschlossen. Der Zellextrakt wurde 30 min. bei 20 000 g zentrifugiert und die Acetyl-CoA-Carboxylase zwischen 25 und 42 % Ammoniumsulfatsättigung aus dem Überstand gefällt. Der Niederschlag wurde in 5 mM K_2HPO_4 , 20 % Glyzerin aufgenommen, gegen den gleichen Puffer dialysiert und durch Zusatz von 1 mg Gel pro 1 mg Protein an Calciumphosphatgel (hergestellt nach Keilin und Hartree (56)) adsorbiert. Die Desorption des Enzyms erfolgte mit 120 mM Phosphatpuffer pH 7. Danach wurde bei 50 % Ammoniumsulfatsättigung konzentriert, gegen 10 mM Phosphatpuffer pH 7 dialysiert und die Proteinlösung sofort auf eine 3 Liter DEAE-Zellulosesäule (10 x 38 cm) aufgesetzt. Das Enzym wurde mit dem Dialysepuffer im Ausschlußvolumen eluiert. Die aktivsten Fraktionen wurden ohne weitere Konzentrierung auf eine Phosphozellulosesäule (2 x 30 cm) aufgesetzt und die Acetyl-CoA-Carboxylase Aktivität mit einem Gradienten von 10 bis 500 mM Kaliumphosphat pH 7.0, 20 % Glyzerin eluiert. Das Aktivitätsmaximum lag bei etwa 0.1 M. Nach Konzentration durch Dialyse gegen einen 50 mM Phosphatpuffer pH 7.0, 20 % Glyzerin, der

Tab. 11: Anreicherung der Biotin-Carboxylase aus E.coli B
1 kg E. coli B (Feuchtgewicht) wurden eingesetzt.

Fraktion	Protein (mg)	Ges.Akt. (U)	spez.Akt. (U/mg)	Anreich. Faktor	Ausbeute (%)
Zellfreier Rohextrakt	120 000	342	0.0029	-	100
25-42% Am- moniumsulfat	32 000	182	0.0057	2.0	53
Calciumphos- phat-Gelad- sorption	5 900	202	0.0342	6.0	59
Chromatogr. an DEAE- Zellulose	68	150	2.21	64.6	44
Chromatogr. an Phospho- Zellulose	18	95	5.3	2.4	28

soviel Ammoniumsulfat enthielt, daß sich bei Gleichgewicht eine Sättigung von 60 % ergab, wurden die Präparationen bei -30° C aufbewahrt. Die Enzymaktivität blieb über mehrere Monate hinweg stabil.

Für routinemäßige Tests mit der Biotincarboxylase als Hilfsenzym wurde eine durch Chromatographie an DEAE-Zellulose gereinigte Präparation eingesetzt.

2. Carboxyl-Transferase

Die Reinigung der Carboxyl-Transferase ist bis zur Calciumphosphatgelfraktionierung mit der Anreicherung der Biotincarboxylase identisch.

Die Desorption der Carboxyl-Transferase vom Gel erfolgte durch Elution mit 500 mM Phosphatpuffer, pH 7.0. Danach wurde bei 60 % Ammoniumsulfatsättigung konzentriert, gegen

25 mM Phosphatpuffer pH 7.0 dialysiert und die Proteinlösung auf eine 2 l DEAE-Zellulosesäure (10 x 26 cm) aufgesetzt. Das Enzym wurde mit einem linearen Gradienten von 25 bis 500 mM Phosphat pH 7.0 bei etwa 0.2 M eluiert. Nach Konzentration mit Ammoniumsulfat (60 % der Sättigung) und Dialyse gegen 25 mM Phosphatpuffer pH 7.0 wurde die Enzymlösung über eine Phosphozellulosesäule (2 x 50 cm mit einem linearen Gradienten von 25 bis 300 mM Phosphat, pH 7.0, fraktioniert. Nach Konzentration durch Ultrafiltration wurden die Präparationen in 50 mM Phosphatpuffer pH 7.0, 5 mM Dithiothreitol bei -30° C aufbewahrt. Die Aktivität nahm in fünf Monaten um etwa die Hälfte ab. Tab. 12 zeigt die Daten der Anreicherung, mit der das beste Ergebnis erreicht wurde. Auf Grund von hohen Nebenaktivitäten in den ersten Fraktionen wurde auf die Bestimmung der enzymatischen Aktivität bis nach dem Gelschritt verzichtet. Bedingt durch die hohen Verluste bei der Chromatographie an Phosphozellulose wurde im allgemeinen dieser letzte Schritt ausgelassen.

Tab.12: Anreicherung der Carboxyl-Transferase aus E.coli B
1 kg E.coli B (Feuchtgewicht) wurden eingesetzt.

Fraktion	Protein (mg)	Ges.Akt. (U)	spez.Akt.	Anreich. Faktor	Aus- beute %
Zellfreier Rohextrakt	110 000	-	-	-	-
25-42 % Ammo- niumsulfat	25 000	-	-	-	-
Calciumphosphat- geladsorption	2 700	3 100	1.15	-	100!
Chromatogr.an DEAE-Zellulose	190	1 900	10.0	8.70	61
Chromatogr. an Phosphozellulose	12	390	32.5	3.25	13

3. Carboxyl Carrier Protein

Das Carboxyl Carrier Protein aus E.coli B wurde aus den Fraktionen gewonnen, die bei der Anreicherung der beiden anderen Teilenzyme (siehe V., Kap. 1 und 2) nicht an das Calciumphosphatgel adsorbierten. Das weitere Reinigungsverfahren entsprach in allen Einzelheiten der Anreicherung des Carboxyl Carrier Proteins aus Achromobacter IVS (siehe II, B.1)

In reiner Form wurden zwei Biotinylproteine erhalten, die aus SDS-Polyacrylamidgelen den Molekulargewichten 22 000 und 10 000 entsprachen. Präparativ wurden sie mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung in Flachgelen getrennt.

L. Isolierung des Carboxyl Carrier Proteins aus Achromobacter IVS

200 g frisch geerntete und in Biotin-freiem Medium gewaschene Zellen der logarithmischen Wachstumsphase werden in 750 ml 10 mM K_2HPO_4 , 5 mM Thioglykol, 1 mM EDTA suspendiert. Die Suspension wird in 150 ml Portionen mit 300 g Glasperlen (31/10) 3 Minuten im Homogenisator nach Merckenschlager, Schlossmann und Kurz (25) unter Kühlung aufgeschlossen, wobei die Suspension unmittelbar vor Aufschluß mit PMSF zu einer Endkonzentration von 5 mM versetzt wird.

Anschließend werden die Zellfragmente 30 Min. bei 20 000 g abzentrifugiert. Die Radioaktivität wird bei 80 % Ammoniumsulfatsättigung aus dem Überstand gefällt. Die Suspension wird 20 Min. bei 40 000 g zentrifugiert und der Niederschlag in 50 mM Phosphatpuffer pH 7 aufgenommen.

Die Lösung wird mit festem Guanidinhydrochlorid bis zu einer Endkonzentration von 6 M versetzt, eine Stunde bei 4° C gerührt und über Nacht gegen 50 mM Phosphatpuffer dialysiert. Der voluminöse Niederschlag wird abzentrifugiert und zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen.

Aus den vereinigten Überständen wird die Radioaktivität wiederum mit Ammoniumsulfat bei 80 % Sättigung gefällt. Nach Zentrifugation wird der Niederschlag in 0.5 M KCl, 50 mM Phosphat, 0.1 mM EDTA pH 7 aufgenommen. Ungelöstes Protein wird abzentrifugiert.

Affinitätschromatographie an Avidin-Sepharose

Die teilweise angereicherte Carboxyl Carrier Protein Präparation (etwa 0.8 g Protein in 50 ml) wird mit 40 ml frisch hergestellter Monomer-Avidin-Sepharose versetzt und über Nacht unter Rotieren bei 4° C inkubiert. Danach wird das Gel in eine Säule gegossen (Durchmesser 4 cm) und mit 300 ml H₂O gewaschen.

Die Säule wird nacheinander mit folgenden Puffern eluiert (siehe Abb.16):

- A. 150 ml 0.5 M KCl in 50 mM Phosphatpuffer pH 7
- B. 70 ml 0.5 M KCl in 0.2 M Glycin NaOH, pH 9
- C. 25 ml 0.5 M KCl in 0.2 M Glycin NaOH, pH 9 + 10 mM d-Biotin
- D. 50 ml 6 M Guanidin HCl in 50 mM Phosphatpuffer pH 7
- E. 130 ml 6 M Guanidin HCl in 50 mM H₃PO₄ pH 2

Alle Puffer enthalten 1 mM EDTA.

Die aktiven Fraktionen werden vereinigt, mit Ammoniumsulfat bis 80 % Sättigung versetzt und eine Stunde bei 110 000 g zentrifugiert. Der unsichtbare Niederschlag wird in 50 mM Phosphatpuffer pH 7 mit 2 mM Dithiothreitol gelöst und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Tab.5 zeigt die Daten einer typischen Anreicherung.

M. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

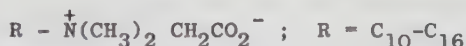
1. Präparative IEF in der Säule

Die isoelektrische Fokussierung des Biotin Carboxyl Carrier Proteins wurde in einer 110-ml-LKB-Apparatur nach der beiliegenden Vorschrift durchgeführt. Ampholine-lösung pH 3-5 wurde zunächst durch ein Membranfilter von 0.15 μ Porenweite gedrückt und dann auf 1 % verdünnt. Die Kathode wurde unten, die Anode oben angelegt. Als Kathodenflüssigkeit wurde Natronlauge, als Anodenflüssigkeit Schwefelsäure verwendet. Die Proteinlösung wurde mit etwa dem 1 1/2fachen Volumen "leichter" und "schwerer" Ampholinelösung versetzt und auf dem Gradienten aufgesetzt, nachdem die Säule etwa zur Hälfte gefüllt war. Die Säule wurde mit Wasser von 5° gekühlt. Bei abnehmender Stromstärke wurde die Spannung in dem Maße erhöht, daß 3 Watt nicht überschritten wurden. Blieb die Stromstärke dann konstant, wurde nach einem weiteren Tag die isoelektrische Fokussierung beendet. Das Biotin-Carboxyl Carrier

Protein wurde über eine kurze Sephadex G 25-Säule, die mit Pyridin/Acetat-Puffer pH 6.5 (10:0.4:90) äquilibriert war, von der Ampholinlösung abgetrennt.

2. Präparative IEF in granulierten Flachgelen

Da bei Überladung der präparativen Säule die Proteine an ihrem isoelektrischen Punkt ausfallen und beim Fraktionieren des Sucrosegradienten über viele Fraktionen "verschmieren", wurden Rohextrakte in einer Sephadex G75 Dünnschicht im wesentlichen nach Winter et al. (57) fokussiert. 5 g Zellen wurden in 1 % Glycin, pH 6.5, 1 mM EDTA, 5 mM PMSF aufgeschlossen. Um auch bei dieser Methode Ausfälle zu vermeiden, wurden die aufgeschlossenen Zellen über Nacht mit 0.1 % Empigen BB, einem amphotären Detergens des Alkylbetain Types mit der Strukturformel



inkubiert (58).

Der Aufschluß wurde dann mit H₂O dest. auf 100 ml verdünnt und mit 5 g gewaschenem Sephadex 975 superfein und mit Carrier Ampholyten von pH 4-10 gemischt. Danach wurde die Suspension auf eine mit einem Gummirand versehene Glasplatte gegossen und 14 Stunden bei 4° C und 8 Watt der Länge nach fokussiert.

3. Analytische IEF auf Polyacrylamid Flachgelen

Die analytische IEF erfolgte entweder auf selbstgefertigten Gelen oder fertig gekauften PAG-Platten (LKB im Bereich pH 3.5 - 10 nach Karlson et al. (59)).

N. Polyacrylamidgel-Elektrophoresen

1. Disk-Elektrophoresen wurden nach Maurer (52) System II ausgeführt.
2. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen entsprachen der Methoden von Laemmli (24). Die Gele enthielten jedoch zusätzlich 6 M Harnstoff.

In einigen Fällen wurde auch ein System verwendet, das von der Firma Boehringer (Mannheim) (61) in Anlehnung an Shapiro et al. (62) und Weber und Osborne (63) entwickelt worden ist.

O. Aminosäureanalyse

Die Aminosäureanalyse von Aminosäuregemischen erfolgte im Aminosäureanalysator (Biotronik) mit angeschlossenem Integrator (System I, Biotronik). Die Aminosäuregemische wurden auf eine Kationenaustauschersäule (Durrum DC-6A) gepumpt und mit Lithium-citratpuffer (64) eluiert. Die Aminosäuren werden mit Ninhydrin-Reagenz (64) nachgewiesen.

1. Proteinhydrolyse mit Salzsäure

Die Methode der HCl-Hydrolyse von Acetyl-CoA-Carboxylase entspricht Vorschlägen von Hare (26), Blackburn (27) und von Tristram und Smith (28).

2 bis 5 nmol Carboxyl Carrier Protein wurden jeweils in drei ausgezogene dickwandige Reagenzgläser (Pyrex oder Durrum) (19 x 1,3 cm) gegeben. Nach Lyophilisation bis zur Trocknen wurde jeweils 1 ml 6 N HCl (konstant siedende HCl) mit 0.1 % (v/v) Thioglykol und 0.1 % Phenol zugesetzt. Die Reagenzgläser wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, im Ölpumpenvakuum unter langsamem Auftauen evakuiert und zugeschmolzen. Die Hydrolase fand bei 106° C statt. Nach 24, 48 und 72 h wurde jeweils ein Reagenzglas geöffnet und sofort am Rotationsverdampfer

(Badtemperatur: 40° C) getrocknet. Der Rückstand wurde in einem definierten Volumen Probenverdünnungspuffer (64) aufgenommen und zur Entfernung unlöslicher Bestandteile zentrifugiert (5 min bei 10⁴ g, Hettich Mikroliter-Zentrifuge).

2. Proteinhydrolyse mit Methansulfonsäure

Die Proteinhydrolyse mit 4 N Methansulfonsäure und 0.2 % Tryptamin erfolgte nach Moore (30). Protein wurde wie zur HCl-Hydrolyse vorbereitet und dann in mindestens 250 µl frisch hergestellter 4 N Methansulfonsäure und 0.2 % Tryptamin 24 h bei 115° C hydrolysiert. Nach Öffnen der Reagenzgläser wurde die Aminosäurelösung mit 3.5 N LiOH auf pH = 2.0 bis pH = 2.2 gebracht und mit Probenverdünnungspuffer (64) auf ein definiertes Volumen aufgefüllt.

3. Perameisensäureoxydation

Protein wurde nach Hirs (29) mit Perameisensäure oxydiert. 5 bis 10 nmol Carboxyl Carrier Protein aus *Achromobacter* wurden auf ein Volumen von etwa 50 µl durch Lyophilisation konzentriert. Die Proteinlösung wurde anschließend 4 h bei 0° C mit frisch hergestelltem Perameisensäure-Reagenz (2 ml) inkubiert. Das Perameisensäure-Reagenz wurde durch Mischung von 1 ml 30 % H₂O₂, 8 ml Ameisensäure und 1 ml H₂O und anschließende einstündige Inkubation bei 23° C hergestellt. Nach Abkühlung auf 0° C wurde es sofort eingesetzt. Das Reagenz wurde aus der Protein enthaltenden Mischung entfernt, indem die Mischung mit einem großen Volumen H₂O (80 ml) bei + 2° C verdünnt und anschließend zur Trocknen lyophilisiert wurde. Diese Prozedur wurde dreimal mit jeweils kleineren H₂O-Zusatz-Volumina wiederholt.

4. Fluorimetrische Tryptophanbestimmung

Fluorimetrisch wurde der Tryptophangehalt nach einer Methode, die von Pajot (32) entwickelt worden ist, bestimmt.

Hierbei wird das Protein durch 30 Minuten Inkubation bei 25° C in 6 M Guanidinhydrochlorid, 30 mM Thioglykol bei pH 6.9 aufge-

faltet. Die Fluoreszenzküvette enthielt in unseren Versuchen ca. 5 μ M Protein. Die interne Kalibrierung erfolgte durch dreimaligen Zusatz von jeweils 5 μ l einer 360 μ M Stammlösung an Tryptophan. Angeregt wurde bei 295 nm; die bei 354 nm gemessenen Werte wurden rechnerisch für die erfolgte Verdünnung in der Küvette korrigiert und in ein Diagramm als Funktion der "freien" Tryptophankonzentration aufgetragen (s. Abb. 22). Die Achsenabschnitte auf der Abszisse ergaben den Tryptophangehalt des jeweiligen Proteins ausgedrückt in "freien" Tryptophanäquivalenten.

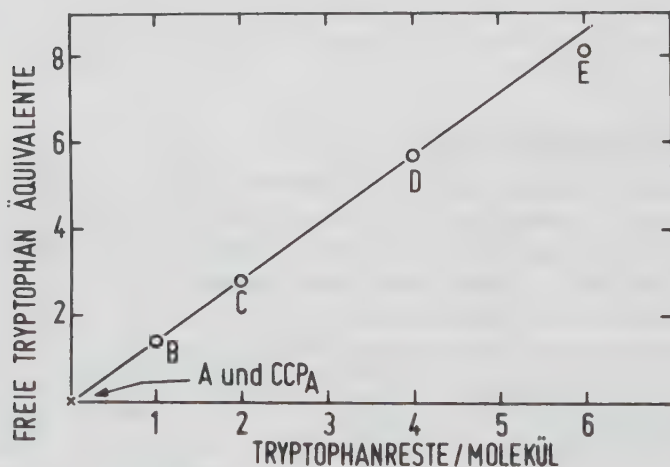


Abb. 41 : Fluoreszenz von Proteinen gemessen als freie Tryptophanäquivalente als Funktion des tatsächlichen Tryptophangehaltes

A: Ribonuclease A	(65)
B: Cytochrom c	(66)
C: Trypsininhibitor aus Sojabohnen	(67)
D: Trypsin vom Rind	(68)
E: Lysozym aus Hühnereiweiß	(69)

Für eine Reihe von Eichproteinen mit bekanntem Tryptophangehalt wurden diese Werte, dividiert durch die jeweilige Konzentration des Proteins in der Küvette, gegen den tatsächlichen Tryptophangehalt pro Proteinkette aufgetragen. Aus der Eichgeraden wurde ein Korrekturfaktor von 1.42 ermittelt, d.h. "gebundenes" Tryptophan fluoresziert im Durchschnitt in unserem System 1.42-fach stärker als "freies" Tryptophan (Abb. 36).

P. Herstellung von Anti-Carboxyl-Carrier-Serum

Kaninchen wurden viermal im Abstand von vierzehn Tagen jeweils 100 µg des gereinigten Carboxyl Carrier Proteins unter Zusatz von komplettem Freund'schen Adjuvants (1:1, v/v) subcutan gespritzt (70). Am fünfzigsten Tag nach Anfang der Immunisierung wurde ca. 100 ml Blut abgenommen. Die γ -Globulin-Fraktion wurde mit 45 % Ammonsulfat aus dem Serum gefällt, in einem Viertel des Anfangsvolumens aufgenommen, gegen 0.1 M NaCl dialysiert und ohne weitere Reinigung verwendet.

Q. Immun-Diffusion

Doppeldiffusionsexperimente wurden nach einer Methode von Bennich et al. (75) durchgeführt, die auf ursprünglich von Ouchterlony (76) entwickelt worden ist.

Eine 1 bis 2 mm dicke 1,5 %ige Agarose-Lösung in 0.3 M Phosphat-Puffer pH 8 wurde auf eine 7 x 8 cm Glasplatte pipettiert. Nach dem Erhärten des Gels wurden 4 mm Löcher gestanzt und 10-15 µl der Antiserum- bzw. Antigenlösungen aufgetragen. Nach erfolgter Diffusion wurden Filterpapiere auf die Platte gelegt (Whatman 1), die Platten gepreßt, getrocknet und in einigen Fällen nach Auswaschen des nicht präzipitierten Proteins mit Coomassie angefärbt.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Acetyl-CoA-Carboxylase aus *Achromobacter* wurde untersucht. Im einzelnen wurden die folgenden Ergebnisse erzielt.

1. Die Acetyl-CoA-Carboxylase Aktivität wurde in Rohextrakten aus *Achromobacter* IVS nachgewiesen.
2. Die spezifische Acetyl-CoA-Carboxylase Aktivität verhält sich proportional zur Wachstumsgeschwindigkeit von *Achromobacter* IVS.
3. Daß die Acetyl-CoA-Carboxylase unter physiologischen Bedingungen ein membrangebundenes Enzym ist, wurde durch Isolierung einer aktiven Membranfraktion nachgewiesen.
4. Die Acetyl-CoA-Carboxylase wurde in ihre Teilenzyme gespalten und diese getrennt angereichert.
5. Die Biotin-Carboxylase wurde 1100-fach angereichert. Sie hat ein Molekulargewicht von 100 000 und sedimentiert mit einem Koeffizienten von 5.3 S. Ihr scheinbarer isoelektrischer Punkt liegt bei pH 4.8.
6. Die Carboxyl-Transferase wurde etwa 36-fach angereichert. Es konnte gezeigt werden, daß sie sehr spezifisch für Acetyl-CoA ist. Ihr scheinbarer isoelektrischer Punkt liegt bei pH 5.3.
7. Zwei verschiedene Carboxyl Carrier Proteine wurden etwa 1500-fach angereichert. Die Untersuchungen deuten darauf hin, daß das kleinere (11 000 Dalton) aus dem größeren (22 000 Dalton) durch proteolytische Spaltung entsteht.
8. Die K_M -Werte für das Carboxyl Carrier Protein (11 000) als Substrat in den beiden Teilreaktionen der Acetyl-CoA-Carboxylase wurden bestimmt. In der Biotin-Carboxylierung ist $K_M = 3 \times 10^{-7}$ M, im Carboxyl Transfer ist $K_M = 5 \times 10^{-7}$ M.

9. Die Aminosäureanalyse des Carboxyl Carrier Proteins (11 000) aus *Achromobacter* und immunologische Untersuchungen deuten auf weitgehende Homologie der Primärsequenzen von CCP aus *Achromobacter* und CCP aus *E.coli* hin.
10. Aus den angereicherten Teilenzymen wurde eine aktive Acetyl-CoA-Carboxylase rekonstituiert.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, daß die Acetyl-CoA-Carboxylase aus *Achromobacter* IVS aus drei verschiedenen unifunktionellen Einheiten besteht. Entwicklungsgeschichtlich gehört sie deshalb zu den ältesten Biotinenzymen, wie auch die Acetyl-CoA-Carboxylase aus *E. coli*. Daß nicht nur eine strukturelle Verwandtschaft besteht, wird durch die identischen antigenen Determinanten und der Ähnlichkeit in der Aminosäurezusammensetzung der beiden Carboxyl Carrier Proteine aus *Achromobacter* und aus *E.coli* belegt.

Aus *Achromobacter* kann auch ein weiteres Biotinenzym, die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase, isoliert werden, das aber weder strukturelle noch antigene Gemeinsamkeiten mit der Acetyl-CoA-Carboxylase hat. Verschiedene Entwicklungsstufen der Biotinenzyme existieren also nebeneinander in der gleichen Zelle.

Literaturverzeichnis

1. Moss, J., and Lane, M.D., Adv. in Enzymology 36, 321 (1971)
2. Kögl, F., and Tönnis, B., Biochem. J. 89, 585 (1963)
3. Lynen, F., Knappe, J., Lorch, E., Jütting, G. und Ringelmann, E., Angew. Chem. 71, 481 (1959)
4. Alberts, A.W., and Vagelos, P.R., in: The Enzymes, 3rd. ed. 6, 37 (1972) (Boyer, P.D., ed.), Academic Press, New York
5. Wood, H.G., in: The Enzymes, 3rd. ed. 6, 83 (1972) (Boyer, P.D., ed.), Academic Press, New York
6. Green, N.M., Valentine, R.C., Wrigley, N.G., Ahmad, F., Jacobson, B.E., and Wood, H.G., J. Biol. Chem. 247, 6284 (1972)
7. Ahmad, F., Lygre, D., Jacobson, B.E., and Wood, H.G., J. Biol. Chem. 247, 6299 (1972)
8. Guchhait, R.B. Plakis, S.E., Dimroth, P., Stoll, E., Moss, J. and Lane, M.D., J. Biol. Chem. 249, 6633 (1974)
9. Schiele, U., Niedermeier, R., Stürzer, M. und Lynen, F., Eur. J. Biochem. 60, 259 (1975)
10. Lane, M.D., Polakis, S.E., and Moss, J., in: Subunit-Enzymes (Ebner, K.E., ed.), 2, 181 (1975), Marcel Dekker, Inc. New York
11. Kannangara, C.G., and Stumpf, P.K., Arch. Biochem. Biophys 155, 391 (1973)

12. Yourno, J., Kohno, T., and Roth, J.R., Nature 228, 820 (1970)
13. Fall, R.R., Alberts, A.W., and Vagelos, P.R., Biochem. Biophys. A. 379, 496 (1975)
14. Schiele, U., Dissertation, Universität München (1973)
15. Schiele, U., persönliche Mitteilung (1974)
16. Matsubashi, M., Matsubashi, S., Numa, S. und Lynen, F., Biochem. Z. 340, 243 (1964)
17. Foster, D.W., and McWorther, W., J. Biol. Chem. 244, 260 (1969)
18. Heger, W. und Peter, H.W., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 261 (1976)
19. Alberts, A.W., and Vagelos, P.R., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 59, 561 (1968)
20. Jacobson, B., Gerwin, B.J., Ahmad, F., Waegele, P., and Wood, H.G., J. Biol. Chem. 245, 6471 (1970)
21. Nervi, A.M., Alberts, A.W., and Vagelos, P.R., Arch. Biochem. Biophys. 143, 401 (1971)
22. Fall, R.R., Nervi, A.M., Alberts, A.W., and Vagelos, P.R., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 68, 1512 (1971)
23. Fall, R.R., and Vagelos, P.R., J. Biol. Chem. 248, 2078 (1973)
24. Laemmli, U.K., Nature 227, 680 (1970)
25. Merckenschlager, M., Schlossmann, K. und Kurz, W., Biochem. Z. 329, 332 (1957)

26. Hare, P.E., in: Protein Sequence Determination, 2nd ed.
204 (1975), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg,
New York
27. Blackburn, S., in: Amino Acid Determination, Marcel Dekker,
Inc., New York (1968)
28. Tristram, G.R., and Smith, R.H., Adv. Prot. Chem. 18, 227
(1963)
29. Hirs, C.H.W., J. Biol. Chem. 219, 611 (1956)
30. Moore, A.T., in: Chemistry and Biology of Peptides
(Meienhofer, J., ed.) 629 (1972), Ann Arbor Science
Publishers
31. Simpson, R.J., Neuberger, M.R., Lin, T.-Y., J. Biol.
Chem. 251, 1936 (1976)
32. Pajot, P., Eur. J. Biochem. 63, 263 (1976)
33. Fall, R.R., and Vagelos, P.R., J. Biol. Chem. 247, 8005
(1972)
34. Gerwin, B.J., Jacobson, B., and Wood, H.G., Proc. Natl.
Acad. Sci. U.S. 64, 1315 (1969)
35. Fall, R.R., and Vagelos, P.R., J. Biol. Chem. 248, 2078
(1973)
36. Spieß, J., Dissertation, Universität München, 1976
37. Oesterhelt, D., and Soeckenius, W., Nature-New Biology
233, 149 (1973)
38. MacLennan, D.H., Seeman, P., Eilles, G.H., and Yip, C.C.,
J. Biol. Chem. 246, 2702 (1971)

39. Ellman, G.L., Arch. Biochem. Biophys. 82, 70 (1959)
40. Morino, Y., and Snell, E.E., J. Biol. Chem. 242, 5602 (1967)
41. Kaziro, Y., Hass, L.F., Boyer, P.D., and Ochoa, S., J. Biol. Chem. 237, 1460 (1962)
42. Martin, R.G., and Amers, B.N., J. Biol. Chem. 236, 1372 (1961)
43. Jauch, R. und Lynen, F., unveröffentlichte Ergebnisse
44. Kannangara, C.G. und Jensen, C.J., Eur. J. Biochem. 54, 25 (1975)
45. Heger, H.W. und Peter, H.W., persönliche Mitteilung (1976)
46. Tanabe, T., Wada, K., Okazaki, T., and Numa, S., Eur. J. Biochem. 57, 15 (1975)
47. Hallmann, L., Bakteriologische Nährböden, 70, Thieme Verlag, Stuttgart, 1953
48. Fraser, D., and Jerrel, E.A., J. Biol. Chem. 205, 291 (1953)
49. Decker, K., in: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., Hrsgb.), Verlag Chemie, Weinheim, 1974, 2037
50. Simon, E.J., and Shemin, D., J. Am. Chem. Soc. 75, 2520 (1953)
51. Ochoa, S., in: Methods Enzymol. 1, 688 (1955)
52. Maurer, H.R., Disc Electrophoresis. Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1971
53. Ringelmann, E., persönliche Mitteilung (1975)

54. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, T., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E. und Pfeleiderer, G., Z. Naturf. 8b, 555 (1953)
55. Charm, S.E., and Matteo, C.C., Methods in Enz. 22, 476, (1971)
56. Keilin, D., and Hartree, E.F., Proc. Roy. Soc. (London) B124, 397 (1938)
57. Winter, A., Perlmutter, H., Davis, H., LKB-Appl.-Note Nr. 198 (1975)
58. Allen, J., and Humphries, C., LKB-Appl. Note Nr. 106 (1974)
59. Karlsson, C., Davies, H., Öhmanny J., and Andersson, U.-B., LKB-Appl. Note Nr. 75 (1973)
60. Schiele, U., und Stürzer, M., Eur. J. Biochem. 60, 267 (1975)
61. Gebrauchsanweisung zur "Combithek", Boehringer-Mannheim GmbH (1975)
62. Shapiro, A.L., Vinuela, E., Maizel, J.K., Bioch. Biophys. Res. Comm., 28, 815 (1967)
63. Weber, K., and Osborne, M., J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)
64. Handbuch der Aminosäureanalyse, Fa. Biotronik, München (1974)
65. Hirs, C.H.W., Moore, S., and Stein, W.H., J. Biol. Chem. 235, 633 (1960)
66. Margoliash, E., Smith, E.L., Kreil, G., and Tuppy, H., Nature 192, 1125 (1961)
67. Wu, Y.V., and Sheraga, H.A., Biochemistry 1, 698 (1962)

68. Mikes, O., Holeysovsky, V., Tomasek, V., and Sorm, F.,
Biochem. Biophys. Res. Comm. 24, 346 (1966)
69. Canfield, R.E., J. Biol. Chem. 238, 2698 (1963)
70. Harboe, N., and Ingild, A., Scand. J. Immunol. 2,
Supplement 1, 161 (1973)
71. DeMoss, J.A., Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 850 (1965)
72. Chreighton, T.E., and Yanofsky, C., J. Biol. Chem.
241, 4616 (1966)
73. Blume, A.J., and Balbinder, E., Genetics, 53, 577 (1966)
74. Mann, K.G., Fish, W.A., Cox, A.C., and Tanford, C.,
Biochemistry 9, 1348 (1970)
75. Bennich, L., and Karlsson, C., LKB-Appl. Note Nr.
85 (1973)
76. Ouchterlony, Q., Arkiv Kemi 1, 43. (1949)
77. Sumper, M., und Träuble, H., FEBS Lett. 30, 29 (1973)
78. Sumper, M., Eur. J. Biochem. 49, 469 (1974)
79. Gatt, S., and Barenholz, Y., Ann. Rev. Biochem. 42,
61 (1973)

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1974 bis Juni 1976 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. Feodor Lynen am Max-Planck-Institut für Biochemie und am Biochemischen Institut der Universität München ausgeführt.

Herrn Professor Lynen danke ich sehr herzlich für das Interesse, mit dem er an meiner Arbeit und an meiner persönlichen Entwicklung Anteil nahm.

Für seine zuverlässige, sehr selbständige und stets interessierte Mitarbeit bin ich Herrn Harald Wobser zu Dank verpflichtet.

Ferner möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen danken, die durch Diskussion und praktische Hilfe diese Arbeit ermöglichten und unterstützten.

Lebenslauf

Name	E.M. Michael OBERMAYER
geboren am	8. Mai 1948 in Stockholm
Eltern	Dr. Adolf Max Obermayer, Botschafter Gerd Sigrid, geb. Malm, Restauratorin
1954-1958	Deutsche St. Petri Schule, Kopenhagen
1958-1960	Niculaus Cusanus Gymnasium, Bad Godesberg
1960-1966	Deutsche Schule, Den Haag
1966	Abitur
1967-1968	Wehrdienst
1969-1973	Studium der Chemie an der Kungliga Tekniska Högskolan, Stockholm
1973	Diplomarbeit am Karolinska Institutet, Stockholm, und Diplomprüfung
1974-1976	Dissertationsarbeit unter Anleitung von Professor Dr. F. Lynen, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, und Institut für Biochemie der Universität München

5. Juli 1976

